

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/IT04/000722

International filing date: 23 December 2004 (23.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT
Number: RM2003000601
Filing date: 24 December 2003 (24.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/IT 2004/ 0 0 0 7 2 2



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

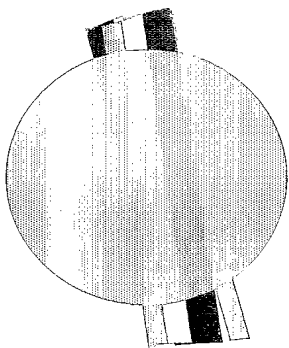
Ufficio G2



**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2003 A 000601.**

Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

ROMA li.....15-FER 2005



IL FUNZIONARIO

.....Giampiero Carlotto
Giampiero Carlotto

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

RM 2003 A 000601

A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	Lay Line Genomics S.p.A.		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PG	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 03874081007
INDIRIZZO COMPLETO	A4	Via di Castel Romano 100 - 00128 Roma- Italia		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1	S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	PG	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 80035060328
INDIRIZZO COMPLETO	A4	Via Beirut 2/4 - 34014 Trieste - Italia		
B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO				
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B0	(D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
INDIRIZZO	B1			
CAP/ LOCALITA'/PROVINCIA	B2			
C. TITOLO				
	C1	Metodo per l'umanizzazione di anticorpi e anticorpi umanizzati con esso ottenuti.		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1	CATTANEO Antonino
NAZIONALITA'	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	COVACEUSZACH Sonia
NAZIONALITA'	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	LAMBA Dorian
NAZIONALITA'	D2	Italiana
COGNOME E NOME	D1	
NAZIONALITA'	D2	

E. CLASSE PROPOSTA

SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
E1	E2	E3	E4	E5

F. PRIORITA'

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO	F2	
NUMERO DOMANDA	F3		DATA DEPOSITO	F4	
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI					
G1					
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I					

olga capasso

MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI, CONSAPEROVOLI DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART.76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N.455.

NUMERO ISCRIZIONE ALBO E NOME:	I1	820B CAPASSO OLGA; 473BM FIORUZZI MARIA AUGUSTA
DENOMINAZIONE STUDIO	I2	DE SIMONE & PARTNERS S.P.A.
INDIRIZZO	I3	Via Vincenzo Bellini 20
CAP/ LOCALITA'/PROVINCIA	I4	00198 Roma
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1	I titolari partecipano ai diritti sul brevetto nelle seguenti misure: LayLine Genomics S.p.A. quota 5/6, S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati quota 1/6, ai sensi dell'art. 19 R.D. . 1127/39 Si allega dichiarazione sostitutiva di lettera d'incarico

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

Tipo Documento	N. Es. ALL.	N. Es. RIS.	N. PAG. PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ., RIVENDICAZ.	1		67
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN DESCRIZIONE)	1		23
DESIGNAZIONE D'INVENTORE			
DOCUMENTI DI PRIORITA' CON TRADUZIONE IN ITALIANO			
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE			

	(SI/NO)
LETTERA D'INCARICO	NO
PROCURA GENERALE	NO
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	NO

ATTESTATI DI VERSAMENTO
FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI) DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? (SI/NO)
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO? (SI/NO)

Euro	QUATTROCENTOSETTANTADUE/56
A	D F
SI	
NO	

DATA DI COMPILAZIONE

24/12/2003

FIRMA DEL/DEI RICHIEDENTE/I

olga capasso

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA	RM 2003 A 000601		
C.C.I.A.A. DI	ROMA		
IN DATA	24/12/2003	COD.	58
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N. 00		, IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO	
FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.			
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE			
IL DEPOSITANTE	FIMBRO DELL'UFFICIO	L'UFFICIALE ROGANTE <i>Antonio Salerno</i>	

PROSPETTO MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA

RM

2003 A 000601

DATA DI DEPOSITO:

21/6/2003

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO ;

LayLine Genomics SpA, Roma, Italia

S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati, Trieste, Italia

C. TITOLO

Metodo per l'umanizzazione di anticorpi e anticorpi umanizzati con esso ottenuti.

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

SOTTOGRUPPO

E. CLASSE PROPOSTA

O. RIASSUNTO

E' descritto un metodo per la umanizzazione delle regioni variabili VH e VL di un anticorpo animale di sequenza nota, comprendente le fasi di: a) se non disponibile, ottenere la struttura cristallografica delle regioni variabili VH e VL dell'anticorpo animale; b) pre-selezionare una serie da 0 a n di possibili frameworks accettori di anticorpi di origine umana o umanizzati, la cui struttura sia stata determinata sperimentalmente con una risoluzione non inferiore a 3 Å, sulla base del più elevato livello di omologia e di identità con la sequenza primaria del framework dell'anticorpo animale; c) effettuare un confronto strutturale tra le regioni variabili VH e VL dell'anticorpo animale e le regioni VH e VL ottenute in b), rispettivamente, e calcolare per ciascun confronto la RMS, per identificare la regione VH e la regione VL di origine umana con la RMS minore; d) inserire in posizione opportuna le sequenze delle regioni CDR dell'anticorpo animale nelle sequenze umane identificate in c); e) eventualmente retromutare uno o più residui amminoacidici delle regioni VH e VL umane identificate in c). Sono anche descritti anticorpi umanizzati con il metodo dell'invenzione, in particolare anticorpi anti-NGF e anticorpi anti-TrkA.



P. DISEGNO PRINCIPALE

FIRMA DEL / DEI
RICHIEDENTE / I

Alga co pa sss

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale a titolo: "Metodo per l'umanizzazione di anticorpi e anticorpi umanizzati con esso ottenuti"

Titolare: Lay Line Genomics S.p.A. (5/6)

S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati
(1/6)

Inventori: Cattaneo Antonino, Covaceuszach Sonia, Lamba Dorianò

La presente invenzione concerne un metodo per l'umanizzazione di anticorpi, secondo una metodica di determinazione e confronto delle strutture tridimensionali, anticorpi umanizzati così ottenuti e loro usi in terapia e diagnostica in vivo.

L'applicazione terapeutica e diagnostica nell'uomo di anticorpi monoclonali di origine animale ha fondamentali controindicazioni, specialmente per regimi terapeutici che prevedono somministrazioni ripetute. In particolare gli anticorpi monoclonali murini hanno un'emivita in circolo relativamente breve e, quando usati nell'uomo, non possiedono alcune fondamentali caratteristiche funzionali delle immunoglobuline quali la citotossicità dipendente dal complemento e la citotossicità cellulo-mediata.

Inoltre gli anticorpi monoclonali di origine non umana contengono sequenze amminoacidiche immunogene se iniettate nei pazienti. Numerosi studi hanno dimostrato che dopo l'iniezione di un anticorpo estraneo, i soggetti sviluppano una risposta immunitaria piuttosto forte contro l'anticorpo stesso (detta risposta HAMA, human anti mouse

antibodies), eliminandone completamente l'utilità terapeutica, con formazione di immunocomplessi, alterazione della farmacocinetica, produzione di reazioni allergiche etc.

Inoltre, considerando il numero crescente di diversi anticorpi monoclonali sviluppati in topo o in altri mammiferi (e quindi antigenici per l'uomo) per la cura di patologie differenti, trattamenti, anche per terapie non correlate, possono risultare inefficaci o perfino pericolosi a causa della crossreattività. Anche se la produzione dei cosiddetti anticorpi chimerici (regioni variabili murine unite a regioni costanti di origine umana) ha dato qualche risultato positivo, rimane tuttora un significativo problema di immunogenicità.

Gli anticorpi umanizzati hanno almeno tre potenziali vantaggi rispetto agli anticorpi di origine animale nell'ambito dell'uso terapeutico nell'uomo. In primo luogo la regione effettrice, essendo umana, può interagire meglio con le altre parti del sistema immunitario umano, distruggendo le cellule bersaglio in maniera più efficiente mediante citotossicità dipendente dal complemento, o citotossicità cellulo-mediata dipendente dagli anticorpi. Inoltre il sistema immunitario umano non riconosce il framework o la regione costante (C) dell'anticorpo umanizzato come estranea, e quindi la risposta anticorporeale contro l'anticorpo umanizzato è minimizzata, sia rispetto a quella contro un anticorpo murino (totalmente estraneo) che rispetto alla risposta indotta da un anticorpo chimerico (parzialmente estraneo).

È stato riportato che anticorpi murini iniettati nell'uomo hanno un tempo di emivita molto più breve quella di normali anticorpi (Shaw *et al.*, 1987).

Gli anticorpi umanizzati hanno un'emivita molto simile a quella di

anticorpi umani naturali, permettendo una somministrazione meno frequente e dosaggi inferiori.

Il principio base dell'umanizzazione si configura nel trasferire la specificità di riconoscimento antigenico, cioè i domini CDR, nel contesto di un immunoglobulina umana ("CDR grafting", Winter and Milstein, 1991). Sono stati riportati diversi esempi di anticorpi umanizzati prodotti nel tentativo di risolvere il problema dell'immunogenicità (Maeda *et al.*, 1991; Singer *et al.*, 1993; Tempest *et al.*, 1994; Kettleborough *et al.*, 1991; Hsiao *et al.*, 1994; Baca *et al.*, 1997; Leger *et al.*, 1997; Ellis *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1986; Benhar *et al.*, 1994; Sha and Xiang, 1994; Shearman *et al.*, 1991; Rosok *et al.*, 1996; Gussow & Seemann, 1991; Couto *et al.*, 1994; Kashmiri *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 1994; Riechmann *et al.*, 1988; Gorman *et al.*, 1991; Verhoeyen *et al.*, 1988; Foote & Winter, 1992; Lewis & Crowe, 1991; Co *et al.*, 1991; Co *et al.*, 1991; Verhoeyen *et al.*, 1991; Eigenbrot *et al.*, 1994; Hamilton *et al.*, 1997; Tempest *et al.*, 1995; Verhoeyen *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1996; Poul *et al.*, 1995; Co *et al.*, 1992; Graziano *et al.*, 1995; Presta *et al.*, 1993; Hakimi *et al.*, 1993; Roguska *et al.*, 1996; Adair *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1993; Tempest *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 1996; Kolbinger *et al.*, 1993; Zhu and Carter, 1995; Sims *et al.*, 1993; Routledge *et al.*, 1991; Roguska *et al.*, 1994; Queen *et al.*, 1989; Carter *et al.*, 1992).

La transizione di un anticorpo da animale (in genere murino) a umanizzato comporta il compromesso fra opposti requisiti, la cui soluzione varia da caso a caso. Per minimizzare l'immunogenicità, l'immunoglobulina dovrà mantenere quanto più possibile della sequenza umana accettrice. Comunque per conservare le proprietà di

legame originarie, il framework dell'immunoglobulina dovrebbe contenere un numero sufficiente di mutazioni nella sequenza umana accettrice a garantire che la conformazione delle regioni CDR sia il più possibile simile a quella nell'immunoglobulina murina donatrice. Come conseguenza di queste opposte considerazioni, per molti anticorpi umanizzati è stata riportata una significativa perdita di affinità di legame rispetto ai corrispondenti anticorpi murini (Jones *et al.*, 1986; Shearman *et al.*, 1991; Kettleborough, 1991; Gorman *et al.*, 1991; Riechmann *et al.*, 1988).



Attualmente il metodo più comune per la produzione di immunoglobuline umanizzate si basa sull'utilizzo di appropriate sequenze genomiche e sintetiche, così come di cDNA (Reichmann *et al.*, 1988).

La domanda di brevetto EP 592106 descrive un procedimento per l'umanizzazione di anticorpi da roditori. Il procedimento si basa sull'individuazione dei residui amminoacidici esposti alla superficie della struttura tridimensionale dell'anticorpo da umanizzare, sull'identificazione dei residui amminoacidici nelle medesime posizioni sull'anticorpo corrispondente umano, e sulla sostituzione dei residui individuati nella sequenza dell'anticorpo da roditore con quelli individuati nell'anticorpo umano.

Gli autori della presente invenzione hanno messo a punto un metodo per ottenere forme ottimizzate umanizzate di immunoglobuline che siano sostanzialmente non immunogene nell'uomo, con un approccio consistentemente basato su dati strutturali, ottenuti sperimentalmente, derivanti da studi cristallografici. Il metodo dell'invenzione permette di

ottenere anticorpi in una forma adatta alla formulazione terapeutica e ad altre applicazioni mediche e diagnostiche.

Descrizione dell'invenzione

L'invenzione concerne un metodo interamente basato su dati strutturali per effettuare le prime fasi di progettazione (generalmente più soggette ad errore) dell'umanizzazione. Le immunoglobuline umanizzate hanno due coppie di eterodimeri fra catena leggera e pesante, con almeno una delle catene recante una o più CDR di origine animale, legata funzionalmente a segmenti di regioni del framework di origine umana. Ad esempio le CDR di origine animale, insieme a residui amminoacidici, associati naturalmente, sempre di origine animale, sono introdotte in regioni framework di origine umana, per produrre immunoglobuline umanizzate capaci di legare i rispettivi antigeni, con affinità paragonabili alle affinità delle immunoglobuline originarie di origine animale.

Il metodo dell'invenzione ha condotto all'ottenimento di anticorpi umanizzati idonei ad applicazioni terapeutiche a diagnostiche. In particolare sono state ottenute immunoglobuline umanizzate derivate da anticorpi anti-TrkA (Brevetto EP 1.181.318) e da anticorpi anti-NGF capaci di legare con elevata specificità rispettivamente TrkA e NGF, neutralizzando l'interazione tra ligando e recettori. Tali molecole sono utilizzabili per il trattamento di tumori dipendenti da NGF/TrkA, del dolore cronico e di forme infiammatorie, e per finalità diagnostiche, per imaging in vivo, per es. su tumori TrkA positivi, o su proencefalo basale come marcatore precoce del morbo di Alzheimer. In particolare gli anticorpi umanizzati anti-TrkA trovano applicazione terapeutica e diagnostica specifica nelle forme infiammatorie dell'apparato urinario e

della zona pelvica. In particolare gli anticorpi umanizzati anti-NGF trovano applicazione terapeutica e diagnostica specifica nelle patologie indotte da virus HIV, per indurre apoptosi di cellule immunitarie, come i macrofagi infettati da HIV, NGF dipendenti.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un metodo per metodo per la umanizzazione delle regioni variabili VH e VL di un anticorpo animale di sequenza nota, comprendente le fasi di:

- a) se non disponibile, ottenere la struttura cristallografica delle regioni variabili VH e VL dell'anticorpo animale;
- b) pre-selezionare una serie da 0 a n di possibili frameworks accettori di anticorpi di origine umana o umanizzati, la cui struttura sia stata determinata sperimentalmente con una risoluzione non inferiore a 3 Å, sulla base del più elevato livello di omologia e di identità con la sequenza primaria del framework dell'anticorpo animale;
- c) effettuare un confronto strutturale tra le regioni variabili VH e VL dell'anticorpo animale e le regioni VH e VL ottenute in b), rispettivamente e calcolare per ciascun confronto la RMS, per identificare la regione VH e la regione VL di origine umana con la RMS minore;
- d) inserire in posizione opportuna le sequenze delle regioni CDR dell'anticorpo animale nelle sequenze umane identificate in c);
- e) eventualmente retromutare uno o più residui amminoacidici delle regioni VH e VL umane identificate in c).

Preferibilmente le modifiche dell'anticorpo avvengono con tecniche del DNA ricombinante.

In una forma preferita di attuazione l'anticorpo animale è un anticorpo anti-NGF, preferibilmente è l'anticorpo alfa D11, e le sequenze umanizzate hanno essenzialmente le seguenti sequenze VH: Hum alfa D11 VH,

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLE
WVGWVWAGGATDYNALSRFTISRDNKNTAYLQMNSLRAEDTAV
YYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSS,

e VL: Hum alfa D11Vk,

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLI
YNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPR
TFGGGTKVEIK.

In una forma alternativa di attuazione l'anticorpo animale è un anticorpo anti-TrkA, preferibilmente è l'anticorpo MNAC13, e le sequenze umanizzate hanno essenzialmente le seguenti sequenze: VH:
HumMNAC13VH,

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWARQAPGKGLE
WVAYISKGGGSTYYPDTVKGRTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDSAV
YYCARGAMFGNDFFPMDRWGQGTLVTVSSA,

e VL: Hum MNAC13Vk,

DIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPKLLIY
TTSNLAGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCHQWSSYPW
TFGGGTKVEIK.

Le immunoglobuline umanizzate della presente invenzione (o frammenti derivati che conservano attività di legame e altri composti che possono esserne derivati) possono essere prodotte mediante note tecniche del DNA ricombinante. In funzione dell'utilizzo successivo delle

immunoglobuline umanizzate, possono essere utilizzati per la loro espressione animali transgenici o cellule transfettate, preferibilmente cellule eucariotiche immortalizzate (come ad esempio cellule di mieloma o di ibridoma), ma anche ospiti procariotici, cellule di insetto o vegetali. I polinucleotidi codificanti per le risultanti sequenze delle immunoglobuline umanizzate possono anche essere ottenuti per sintesi.

Le immunoglobuline umanizzate della presente invenzione possono essere utilizzate da sole o in combinazione. In caso di usi come antitumorali si preferirà un agente chemioterapico, che può variare a seconda dell'applicazione farmacologica (quali antraciclina, paclitaxel, cisplatina, gemcitabina, farmaci anti-infiammatori non steroidei e corticosteroidi, o immunosoppressori), oltre che con tutti i farmaci correntemente applicati nella cura di ciascuna particolare patologia. Le immunoglobuline umanizzate o i loro complessi possono essere preparati in forma di dosaggi farmacologicamente accettabili, che variano a seconda del tipo di somministrazione.

Definizioni

Il termine "sostanzialmente identico" nel contesto di due polinucleotidi o polipeptidi (rispettivamente sequenze di DNA codificanti per le immunoglobuline umanizzate o sequenze amminoacidiche delle immunoglobuline umanizzate, o porzioni di esse) si riferisce a due o più sequenze che hanno un minimo di 80% (preferibilmente 90-95% o maggiore) di identità nei residui nucleotidici o amminoacidici, quando confrontati e allineati con corrispondenza massima. Generalmente la "sostanziale identità" si verifica in regioni lunghe almeno 50 residui, più



preferibilmente su di una regione di almeno 100 residui o, nelle condizioni ottimali, su oltre 150 residui o sulle sequenze complete. Come descritto in seguito, due sequenze qualsiasi di anticorpi possono essere allineate in un unico modo, usando lo schema di numerazione di Kabat. Di conseguenza per gli anticorpi la percentuale di identità ha un significato unico e ben definito. Gli amminoacidi delle regioni variabili delle catene pesante e leggera delle immunoglobuline mature sono designate con Hx e Lx, con x il numero che designa la posizione dell'amminoacido secondo lo schema di numerazione di Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda MD, 1987 e 1991). Kabat ha elaborato una lista di sequenze amminoacidiche di anticorpi per ciascun sottogruppo e inoltre una lista degli amminoacidi più frequenti in ciascuna posizione in ogni sottogruppo a generare una sequenza consensus. Kabat usa un metodo per assegnare un numero a ogni amminoacido di ogni sequenza riportata nella lista e questo metodo di assegnazione del numero di ogni residuo è diventato un metodo standard nel campo. Lo schema di Kabat può essere esteso ad altri anticorpi non presenti nel suo studio, allineando l'anticorpo in questione con una delle sequenze consensus identificate da Kabat, basandosi sugli amminoacidi conservati. L'uso dello schema di numerazione di Kabat consente di identificare facilmente gli amminoacidi in posizioni equivalenti in diversi anticorpi. Ad esempio, un amminoacido in posizione L10 in un anticorpo di origine umana occupa la posizione equivalente di un amminoacido in posizione L10 in un anticorpo di origine murina.

È noto che l'unità strutturale di base di un anticorpo comprende un tetramero. Ogni tetramero è costituito da due coppie identiche di catene polipeptidiche, ciascuna delle quali è composta da una catena leggera (25 KDa) e da una catena pesante (50-75 KDa). La regione ammino-terminale di ciascuna catena include una regione variabile di circa 100-110 o più amminoacidi, che è coinvolto nel riconoscimento antigenico. La regione carbossi-terminale di ogni catena comprende la regione costante che media la funzione di effettore. Le regioni variabili di ogni coppia di catene leggera e pesante formano il sito di legame dell'anticorpo. Perciò un anticorpo intatto possiede due siti di legame.

Le catene leggere sono classificate come κ oppure λ . Le catene pesanti sono classificate come γ , μ , α , δ , ϵ e definiscono l'isotipo dell'anticorpo quale rispettivamente IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. All'interno sia della catena leggera che della catena pesante, le regioni variabile e costante sono unite da una regione "J" di circa 12 amminoacidi o più, mentre soltanto le catene pesanti includono una regione "D" di circa 10 amminoacidi (Paul, 1993).

Le regioni variabili di ogni coppia di catene leggera e pesante formano il sito di legame dell'anticorpo. Sono caratterizzate dalla stessa struttura generale costituita da regioni relativamente conservate dette framework (FR) unite da tre regioni ipervariabili, dette regioni determinanti la complementarietà (CDR) (Kabat *et al.*, 1987; Chothia and Lesk, 1987). Le CDR delle due catene di ogni coppia sono allineate dalle regioni del framework, acquisendo la funzione di legare un epitopo specifico. Partendo dalla regione ammino-terminale verso la regione carbossi-terminale, i domini variabili sia della catene leggera che della catena

pesante comprendono un alternarsi di regioni FR e CDR: FR, CDR, FR, CDR, FR, CDR, FR; di conseguenza sia la catena pesante che quella leggera sono caratterizzate da tre CDR, rispettivamente CDRH1, CDRH2, CDRH3 e CDRL1, CDRL2, CDRL3. L'assegnazione degli amminoacidi a ogni regione è stata effettuata secondo le definizioni di Kabat (1987 e 1991) e/o Chothia & Lesk (1987), Chothia *et al.* (1989).

Di preferenza gli analoghi delle immunoglobuline umanizzate esemplificate differiscono dalle immunoglobuline originarie per sostituzioni amminoacidiche conservative. Allo scopo di classificare le sostituzioni amminoacidiche come conservative o non conservative, gli amminoacidi possono essere raggruppati come segue:

Gruppo I (catene laterali idrofobiche): M, A, V, L, I;

Gruppo II (catene laterali idrofiliche neutre): C, S, T, N, Q;

Gruppo III (catene laterali acide): D, E;

Gruppo IV (catene laterali basiche): K, R;

Gruppo V (residui che influenzano l'orientazione della catena principale): G, P;

Gruppo VI (catene laterali aromatiche): F, Y, W.

Le sostituzioni amminoacidiche conservative riguardano sostituzioni fra amminoacidi della stessa classe, mentre le sostituzioni amminoacidiche non conservative comportano lo scambio fra membri di classi diverse.

Il termine "epitopo" include ogni determinante proteico in grado di legare in modo specifico un'immunoglobulina. Generalmente gli epitopi sono formati da insiemi di superfici chimicamente attive di macromolecole, quali catene laterali di amminoacidi o zuccheri e generalmente hanno specifiche caratteristiche sia chimico-fisiche che conformazionali.

Il termine "immunoglobuline" si riferisce a proteine che consistono in uno o più polipeptidi codificati da geni delle immunoglobuline. Le immunoglobuline possono esistere in una varietà di forme oltre che come anticorpi tetramerici: includono per esempio frammenti Fv, Fab e F(ab') come anche anticorpi ibridi bifunzionali (Lanzavecchia *et al.*, 1987) e single chain Fv fragments (Hood *et al.*, 1984; Harlow and Lane, 1988; Hunkapiller and Hood, 1986).

Gli anticorpi chimerici sono anticorpi i cui geni per le catene leggera e pesante sono stati ingegnerizzati partendo da regioni geniche di immunoglobuline appartenenti a specie diverse. Per esempio i segmenti variabili (V) dei geni di un anticorpo monoclonale di topo possono essere uniti ai segmenti costanti (C) di un anticorpo di origine umana. Un anticorpo chimerico terapeutico è perciò una proteina ibrida che consiste nel dominio V che riconosce l'antigene derivante da un anticorpo di topo e nel dominio effetore C derivante da un anticorpo umano (anche se possono essere usate altre combinazioni di specie di mammifero).

Il termine "framework" si riferisce a quelle porzioni delle regioni variabili delle catene leggera e pesante delle immunoglobuline che sono relativamente conservate (non appartenenti alle CDR) fra differenti immunoglobuline all'interno di una specie, secondo definizione di Kabat. Quindi un framework umano è una regione di framework che è sostanzialmente identica (almeno 85% o più) al framework che naturalmente si trova negli anticorpi umani.

Il termine "immunoglobulina umanizzata" si riferisce a un'immunoglobulina che comprende un framework umano e almeno



una CDR derivante da un anticorpo non umano e in cui ciascuna regione costante presente è sostanzialmente identica a una regione di immunoglobulina umana (almeno 85%, preferibilmente almeno 90-95% identica). Quindi tutte le parti di una immunoglobulina umanizzata eccetto le CDR sono sostanzialmente identiche alle regioni corrispondenti di una o più sequenze di immunoglobuline umane naturali. Per esempio gli anticorpi chimerici, costituiti da regioni variabili di topo e regioni costanti di origine umana, non sono compresi fra le immunoglobuline umanizzate.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Il metodo è basato sul confronto strutturale ad alta risoluzione per l'umanizzazione di anticorpi di interesse terapeutico e diagnostico in vivo. Inoltre vengono fornite immunoglobuline umanizzate in grado di essere reattive specificamente contro i rispettivi antigeni (ovvero la neurotrofina NGF e il suo recettore TrkA). Le immunoglobuline umanizzate hanno un framework di origine umana e hanno una o più regioni determinanti la complementarietà (CDR) derivanti da ciascuna immunoglobulina originaria, (ovvero α D11, un'immunoglobulina di ratto, reattiva in modo specifico contro NGF e MNAC13, un'immunoglobulina murina, che riconosce specificamente TrkA). Quindi, le immunoglobuline della presente invenzione, che possono essere prodotte agevolmente in larga scala, trovano applicazione terapeutica non solo nella cura di forme di tumori dipendenti da NGF/TrkA, ma anche nel trattamento del dolore cronico e di forme infiammatorie. Inoltre l'immunoglobulina umanizzata specifica per il recettore ha un'ulteriore applicazione diagnostica per imaging in vivo sia su tumori

TrkA positivi che su cellule del proencefalo basale (come marcatore precoce del morbo di Alzheimer).

La presente invenzione impiega i segmenti ricombinanti di DNA codificanti le regioni CDR della catena leggera e/o pesante capaci di legare un epitopo di interesse sia su NGF che su TrkA, come nel caso degli anticorpi monoclonali α D11 e MNAC13 (rispettivamente di ratto e di topo). I segmenti di DNA codificanti per queste regioni vengono uniti ai segmenti di DNA codificanti appropriate regioni framework di origine umana. Le sequenze di DNA che codificano per le catene polipeptidiche comprendenti le CDR della catena leggera e pesante degli anticorpi monoclonali MNAC13 e α D11 sono incluse in Figure 7A, 7B e 8A, 8B rispettivamente. A causa della degenerazione del codice genetico e delle sostituzioni di amminoacidi non critici, le sequenze di DNA possono essere facilmente modificate.

Inoltre i segmenti di DNA tipicamente includono un'ulteriore sequenza di controllo per l'espressione, operativamente legata alle sequenze codificanti per le immunoglobuline umanizzate e comprendente regioni di promotori eterologhi o naturalmente associati. Preferibilmente le sequenze di controllo dell'espressione sono sistemi con promotori eucariotici in vettori capaci di trasformare o transfettare cellule ospite eucariotiche, ma possono essere usate anche sequenze di controllo procariotiche. Una volta che il vettore è stato incorporato nell'appropriato ospite, l'ospite è mantenuto in condizioni adatte a garantire un alto livello d'espressione. Ne segue un'ulteriore purificazione delle catene leggere e pesanti singolarmente, sotto forma di dimeri, di anticorpi intatti o di altre forme di immunoglobuline.

Le sequenze di DNA codificanti per la regione costante umana possono essere isolate mediante ben note procedure da una varietà di cellule umane, ma preferibilmente a partire da cellule B immortalizzate. Le CDR nelle immunoglobuline della presente invenzione sono analogamente derivate dagli anticorpi monoclonali α D11 e MNAC13 capaci di legare rispettivamente NGF e TrkA e prodotti rispettivamente in ratto e in topo. Cellule ospiti adatte per l'espressione e la secrezione di immunoglobuline possono essere ottenute da molte fonti come the American Type Culture Collection (Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, Fifth edition (1985) Rockville, Maryland, USA). Di preferenza le CDR incorporate negli anticorpi umanizzati hanno sequenze corrispondenti a quelle delle CDR di α D11 e MNAC13 e possono includere sequenze nucleotidiche degenerate codificanti le sequenze amminoacidiche corrispondenti degli anticorpi stessi.

Generalmente la procedura di design dell'umanizzazione e' ciclica e iterativa e prevede:

1. L'analisi della sequenza amminoacidica dell'anticorpo murino;
2. Il modelling della corrispondente regione Fv;
3. L'analisi e la selezione della sequenza amminoacidica del framework accettore dell'anticorpo umano;
4. L'identificazione di retro mutazioni putative nel framework scelto;
5. Il design e l'effettiva costruzione dell'anticorpo umanizzato;
6. La verifica mediante saggi in vitro e/o in vivo della mantenuta affinita' e specificita' del legame.

Se queste attività vengono negativamente influenzate dal framework umano sarà necessario cambiare la scelta del framework dell'anticorpo umano accettore, o introdurre mutazioni compensatorie.

Anche se la scelta del framework umano si configura come la fase più critica del ciclo, tuttoggi non sono state stabilite regole generali. Questo dipende dal fatto che i vantaggi delle varie scelte (in termini di immunogenicità nel paziente) non sono stati studiati accuratamente dal punto di vista clinico. Quindi per operare la corretta scelta del framework si dispone soltanto una serie di approcci che è necessario combinare con i risultati precedentemente ottenuti.

In particolare è possibile usare framework fissi (solitamente NEW per la catena pesante e REI per la catena leggera visto che le loro strutture sono disponibili da molto tempo).

Un'altro approccio prevede l'uso dei framework che risultano essere più omologhi in termini di sequenza con l'anticorpo da umanizzare. Ci sono molte banche dati per effettuare la ricerca di anticorpi umani omologhi: la scelta generalmente tiene conto della lunghezza delle CDR, dell'identità a livello di residui canonici e dei residui a livello dell'interfaccia, oltre che a una più elevata percentuale di identità fra le sequenze del donatore e dell'accettore. Per un confronto fra questi due metodi si veda Graziano *et al.* (1995).

Inoltre secondo una variante del secondo approccio si può scegliere la catena leggera e la catena pesante da due diversi anticorpi umani caratterizzati da una più alta omologia di sequenza. Questo approccio è stato proposto da Riechmann *et al.* (1988) e da Shearman *et al.* (1991). A questo riguardo, in generale, catene leggera e pesante derivanti dallo



stesso anticorpo hanno maggiore probabilità di associarsi in modo corretto, formando un sito di legame funzionale, rispetto a catene leggera e pesante derivanti da anticorpi diversi, anche se il fatto che l'interfaccia fra le due catene è piuttosto conservato può garantire ugualmente una corretta interazione. Per un confronto fra questi due metodi si veda Roguska *et al.* (1996 e 1996)

Limitandosi poi a un framework derivante da un particolare anticorpo umano si può rischiare di incorrere in mutazioni somatiche che producono epitopi immunogeni anche se i framework sono di origine umana. Un approccio alternativo è quello di usare framework basati su sequenze consenso umane, dove sono state eliminate mutazioni somatiche idiosincratice. I due approcci sono stati confrontati: in un caso non si è rilevata alcuna differenza nell'avidità di legame (Kolbinger *et al.*, 1993), in un altro invece il legame si è dimostrato superiore nel caso di framework individuali (Sato *et al.*, 1994).

In ogni caso le stesse sequenze consenso sono artificiali e quindi, anche se non hanno residui idiosincratice, possono creare motivi non naturali che risultano immunogeni. L'alternativa (Rosok *et al.*, 1996) è usare sequenze umane germline raccolte nel database V-BASE.

La giustapposizione non naturale delle regioni CDR murine con le regioni variabili del framework di origine umana può dare luogo a limiti conformazionali non rappresentati in natura che, a meno di non venire corrette per mezzo della sostituzione di particolari residui amminoacidici, determinano la perdita dell'affinità di legame. La selezione dei residui amminoacidici da sostituire è determinata parzialmente mediante computer modelling. Sono disponibili infatti

hardware e software per produrre immagini tridimensionali di molecole di immunoglobuline. In generale i modelli molecolari sono prodotti a partire da strutture cristallografiche già risolte di domini o di catene immunoglobuliniche. Le catene da modellare sono confrontate in base alla somiglianza amminoacidica con catene o domini di strutture tridimensionali risolte e le catene o i domini, che mostrano la più alta somiglianza in termini di sequenza, sono selezionate come punti di partenza nella costruzione del modello molecolare. Tuttavia, la predizione della struttura anticorpale non è sempre accurata. In particolare, la terza regione CDR è di difficile modellizzazione e rappresenta sempre un punto di incertezza nella predizione strutturale di un anticorpo (Chothia *et al.*, 1987). Per questo motivo è la norma che gli anticorpi umanizzati, in prima approssimazione, abbiano affinità di legame e/o specificità verso l'antigene molto inferiori di quella dell'anticorpo monoclonale di partenza. Questo richiede molti cicli successivi di mutazioni puntiformi nel tentativo di ricostituire le proprietà dell'anticorpo di partenza, con una procedura di trial and error non completamente razionalizzabile.

Considerando il numero crescente di strutture a raggi X ad alta risoluzione sia di anticorpi umani che umanizzati disponibili, si è voluto evitare le incertezze e ambiguità derivanti dall'utilizzo del computer modelling ottenendo dati strutturali ad alta risoluzione per i frammenti Fab di entrambi gli anticorpi dell'invenzione mediante cristallografia a raggi X. Per questo scopo entrambi gli anticorpi sono stati purificati da ibridoma, trattati proteoliticamente con papaina (una proteasi che taglia a livello della giunzione fra dominio CH1 e CH2 della catena pesante)

che dà origine ai frammenti Fab. A seguito dell'ulteriore purificazione entrambi i frammenti Fab sono stati cristallizzati e da due raccolte di dati (a bassa e ad alta risoluzione) è stato possibile risolvere le strutture mediante il metodo della Sostituzione Molecolare e successivamente affinarle.

L'approccio basato su dati strutturali ottenuti sperimentalmente proposto dall'invenzione fornisce un punto di partenza molto più solido e razionale, sia nella fase critica della selezione del framework dell'anticorpo umano accettare, che per l'identificazione di retro mutazioni putative nel framework scelto all'interno del processo di umanizzazione di entrambi gli anticorpi neutralizzanti.

Fra i vari criteri riportati che possono guidare la scelta del framework dell'anticorpo umano, ci si è basati sul grado di identità tra l'anticorpo di origine murina e umana a livello di sequenza primaria, per estenderne e completare i risultati con un'analisi basata sull'allineamento strutturale. Infatti un'analisi comparata delle corrispondenti strutture associata al criterio originario garantisce un paragone molto più accurato e di conseguenza un'accrescita probabilità che l'anticorpo umanizzato risultante possa preservare le caratteristiche di affinità e specificità dell'anticorpo murino originario. Di conseguenza la strategia utilizzata combina le informazioni derivanti dall'analisi e confronto delle sequenze amminoacidiche, sia in termini di grado di identità che di livello di omologia, con il confronto delle rispettive strutture tridimensionali.

In particolare l'informazione derivante dall'allineamento ottimale delle strutture primarie ha un duplice ruolo. In primo luogo infatti quest'analisi

consente di restringere il numero di possibili strutture terziarie da confrontare, limitandosi a quelle caratterizzate da un elevato grado di omologia e di identità. Fra queste sequenze caratterizzate da un allineamento ottimale a livello di struttura primaria e per le quali sono disponibili dati strutturali, e' stata effettuata un' ulteriore selezione, concentrandosi solo sulle strutture risolte a risoluzione elevata o comunque confrontabile con quella delle strutture da noi ottenute (ovvero non superiore a 2.5\AA). Questo approccio garantisce un allineamento molto piu' accurato delle strutture terziarie e una stima molto piu' significativa delle differenze strutturali, espresse in RMS (root- mean- square deviation: radice quadrata della deviazione quadrata media; Carugo and Pongor, 2001 and 2003). Infatti dati a bassa risoluzione forniscono un'informazione piuttosto indicativa e sicuramente meno precisa sull'effettiva posizione relativa di ogni singolo atomo nello spazio.

Per valutare il grado di sovrapposizione di ogni singola struttura di origine umana o ingegnerizzata e' stato calcolato l'RMS fra atomi di carbonio alfa costituenti i rispettivi scheletri amminoacidici, non considerando le coppie di atomi che abbiano un RMS superiore a 2\AA . Da quest'analisi si ottiene un'informazione che deve tenere conto quindi non solo della diversita' fra le strutture (espressa dal valore dell'RMS), ma anche della percentuale di atomi di carbonio alfa effettivamente impiegata nel calcolo di ciascun RMS.

Questi dati di somiglianza a livello di struttura terziaria sono stati associati all'analisi comparativa delle sequenze primarie sia in termini di identità che di omologia.



Da ciò si deduce che la selezione del framework ottimale per l'umanizzazione si configura in un problema a tre variabili, rappresentabile quindi nello spazio, sia che si associ all'allineamento strutturale il livello di omologia che il grado di identità. Questo tipo di analisi è stata condotta poi anche riducendo le regioni in esame nei due tipi di allineamento alle regioni dei rispettivi frameworks.

Confrontando le distribuzioni degli anticorpi considerati nello spazio delle tre variabili analizzate (rispettivamente valore dell'RMS, percentuali di atomi su cui l'RMS è stato calcolato e un indice di similitudine fra strutture primarie, ovvero percentuale di identità complessiva, di omologia complessiva, di identità a livello del framework, di omologia a livello del framework) con la posizione ottimale nello spazio delle tre variabili che occuperebbe ciascun anticorpo se fosse di origine umana, è possibile individuare chiaramente l'anticorpo di origine umana che più si avvicina a livello di struttura primaria e terziaria a questa posizione ideale. Per razionalizzare questo risultato in ciascuna delle quattro analisi vengono calcolate le divergenze rispetto all'ipotetica posizione ottimale per ciascuna posizione degli anticorpi umanizzati o di origine umana considerati.

Sulla base di questo metodo di selezione è possibile scegliere i framework accettore nel successivo processo di CDR grafting per l'umanizzazione di un dato anticorpo.

In generale è necessario minimizzare le sostituzioni di residui amminoacidici di origine umana con residui di origine murina in quanto l'introduzione di residui murini aumenta il rischio che anticorpo

induca una risposta HAMA nell'uomo. D'altra parte le regioni determinanti la complementarità (CDR) contengono i residui che con maggiore probabilità interagiscono con l'antigene e per questo devono essere mantenute nell'anticorpo umanizzato. Vengono definite per mezzo della sequenza secondo Kabat oppure mediante la struttura secondo Chothia. Il vantaggio di usare il secondo sistema per definirle è che in generale le CDR sono più corte e quindi l'anticorpo umanizzato è costituito da una frazione minore di frammenti xenogenici. Comunque è stato dimostrato che generalmente seguendo le definizioni di Kabat è possibile ridurre drasticamente il numero di cicli necessari all'umanizzazione. Una volta definite le CDR, è necessario identificare le classi canoniche (definite da Chothia e Lesk) cui appartengono e in seguito mantenere i residui canonici nell'anticorpo umanizzato.

E' inoltre essenziale analizzare i residui che mediano l'interazione fra la catena leggera e la catena pesante dei domini variabili (Tabella 1), mantenendo eventuali residui inusuali nell'anticorpo umanizzato (Singer *et al.*, 1993; Daugherty *et al.*;1991; DeMartino *et al.*, 1991).

Inoltre vengono selezionati ulteriori amminoacidi da mantenere in base alla loro possibile influenza sulla conformazione delle CDR e/o sull'interazione con l'antigene. Quando l'amminoacido differisce fra il framework di origine animale e l'equivalente framework di origine umana accettore, l'amminoacido del framework accettore dovrebbe essere sostituito dall'equivalente residuo murino, se è ragionevolmente possibile aspettarsi che l'amminoacido sia in contatto diretto non covalente con l'antigene, oppure sia adiacente a una regione CDR, o in

ogni caso interagisca con una regione CDR (si trova entro 4-6 Å da una regione CDR).

TABELLA 1

Residui che mediano l'interazione fra la catena leggera e la catena pesante dei domini variabili

CATENA VARIABILE LEGGERA L

CATENA VARIABILE PESANTE H

Kabat Position	Mouse	Human	Kabat Position	Mouse	Human
34	H678 N420 A408 Y147 E114	A531 N147 D66	35	H1001 N636 S402 E184	S527 H340 G167 A143
36	Y1653 F198 L96	Y748 F80	37	V2336 I200	V1037 I477 L27
38	Q1865 H47	Q799 H22	39	Q2518 K67	Q1539 R16
44 (A)	P1767 V132 I40	P839 L5	45 (A)	L2636 P16	L1531 P24
46	L1381 R374 P97	L760 V37	47	W2518 L64 Y50	W1534 Y21
87	Y1457 F448	Y795 F41	91	Y2149 F479	Y1429 F116
89	Q1170 L206 F144	Q687 M107	93	A2202 T222 V102	A1346 T90 V71
91	W376 S374 G356 Y295 H182	Y404 R115 S105 A84	95	Y399 G375 S340 D340 R226	D268 G266 R109 E100
96 (A)	L537 Y380 W285	L134 Y215 F78 W73 I71	100k (A)	F1285 M450	F540 M109 L33
98 (A)	F1724	F654	103 (A)	W1469	W323

In particolare un'ulteriore analisi riguarda altri residui che definiscono la cosiddetta zona di Vernier, una zona che stabilizza la struttura delle CDR; è infatti importante che le caratteristiche di questa regione siano mantenute.

Altri residui candidati a essere mutati sono amminoacidi del framework accettore che sono inusuali per un'immunoglobulina umana in quella posizione. Questi residui possono essere sostituiti con amminoacidi derivanti dalla posizione di equivalente di immunoglobuline umane più tipiche o in alternativa residui provenienti dalla posizione equivalente del framework donatore possono essere introdotti nel framework accettore quando tali amminoacidi risultano essere tipici per le immunoglobuline umane in quelle particolari posizioni.



Inoltre sempre sulla base delle sequenze consenso di immunoglobuline umane vengono introdotte nella forma umanizzata mutazioni che inseriscono residui conservati nell'uomo al posto dei residui inusuali presenti sia nel framework donatore che accettore:

Le rispettive coppie di strutture cristallografiche vengono quindi modificate, prima effettuando il grafting delle CDR di origine animale nei framework umani. In seguito vengono introdotte tutte le mutazioni e retro-mutazioni sopradescritte. Le strutture modificate vengono quindi assemblate in immunoglobuline composite. I modelli risultanti vengono raffinati mediante minimizzazione dell'energia meccanica (in termini di angoli di torsione, angoli e distanze di legame) utilizzando il campo di forze.

Per tutte le altre regioni diverse dalle specifiche sostituzioni amminoacidiche discusse, le regioni del framework delle immunoglobuline umanizzate di solito sono sostanzialmente identiche alle regioni del framework degli anticorpi umani da cui sono state derivate. Comunque in queste proteine ingegnerizzate ottenute mediante grafting le regioni del framework possono variare rispetto alle

sequenze native a livello di struttura primaria a causa di parecchie sostituzioni amminoacidiche, di delezioni o inserzioni terminali o intermedie, e altro ancora. Naturalmente la maggior parte dei residui nella regione del framework apporta un contributo diretto molto ridotto se non inesistente alla specificità o all'affinità di un anticorpo. Perciò molte sostituzioni conservative individuali dei residui del framework possono essere tollerate senza apprezzabili variazioni della specificità o dell'affinità nell'immunoglobulina umanizzata risultante. In generale comunque tali sostituzioni non sono desiderabili. E' possibile ottenere modificazioni nella sequenza nucleotidica mediante una varietà di tecniche molto diffuse, come mutagenesi sito-specifica (Gillman & Smith, 1979; Roberts *et al.*, 1987).

In alternativa si possono produrre frammenti polipeptidici comprendenti solo una parte della struttura primaria dell'anticorpo, i quali frammenti conservano una o più attività peculiari delle immunoglobuline (ad esempio l'attività di legame). Questi frammenti polipeptidici possono essere prodotti mediante digestione proteolitica a partire da anticorpi intatti oppure inserendo codoni di stop nelle posizioni volute nei vettori recanti le sequenze di DNA codificanti per le regioni variabili della catena pesante e leggera mediante mutagenesi sito specifica (in particolare dopo la regione CH1 per produrre frammenti Fab o dopo la regione di cerniera per produrre frammenti (Fab')₂. Anticorpi in forma di scFv possono essere ottenuti unendo le regioni variabili della catena pesante e della catena leggera mediante un linker (Huston *et al.*, 1988; Bird *et al.*, 1988). I frammenti Fv o Fab possono essere espressi in *E. coli* (Buchner and Rudolph, 1991; Skerra *et al.*, 1991) o anche in cellule

eucariotiche preferibilmente derivanti da mammifero. Considerando che come molti altri geni, i geni della super famiglia delle immunoglobuline contengono regioni funzionali distinte, ognuna caratterizzata da una o più' specifiche attività biologiche, i geni stessi possono essere fusi a regioni funzionali derivanti da altri geni (ad esempio enzimi) per produrre proteine di fusione (ad esempio immunotossine) dotate di proprietà nuove.

L'espressione di sequenze immunoglobuliniche umanizzate in batteri può essere usata al fine di selezionare sequenze di immunoglobuline umanizzate, caratterizzate da superiore affinità mutagenizzando le regioni CDR e producendo librerie fagiche per il phage display. Usando tali librerie e' possibile effettuare uno screening alla ricerca di varianti a livello delle CDR delle immunoglobuline umanizzate che posseggono una più alta affinità e/o specificità di legame per gli antigeni. Sono stati ampiamente riportati metodi per ottenere librerie per phage-display recanti sequenze delle regioni variabili delle immunoglobuline (Cesareni, 1992; Swimmer *et al.*, 1992; Gram *et al.*, 1992; Clackson *et al.*, 1991; Scott & Smith, 1990; Garrard *et al.*, 1991). Le sequenze risultanti delle varianti di immunoglobuline umanizzate, le cui CDR siano state in tal modo rimodellate, vengono espresse successivamente in un ospite adatto a garantirne un'elevata espressione.

Come riportato in precedenza, le sequenze di DNA vengono espresse nelle cellule ospiti dopo essere state operativamente legate (ovvero posizionate in modo da garantirne la funzionalità) a sequenze di controllo dell'espressione. Questi vettori sono tipicamente replicabili nell'organismo ospite come episomi o come parte integrante del DNA

cromosomico. Comunemente i vettori d'espressione contengono un marcatore selezionabile per permettere di individuare le cellule che sono state trasformate con le sequenze di DNA di interesse.

Per la produzione delle immunoglobuline umanizzate dell'invenzione in forma ricombinante di scFv o in forma di Fab vengono privilegiati sistemi procariotici. *E. coli* e' uno degli ospiti procariotici particolarmente utile per il clonaggio delle sequenze di DNA della presente invenzione. Inoltre e' disponibile un gran numero di promotori ben caratterizzati, come l'operone lac o trp o della β -lattamasi o del fago λ . Questi promotori tipicamente controllano l'espressione e recano siti di legame per il ribosoma, per il corretto inizio e termine della trascrizione e della traduzione. E' possibile aumentare l'emivita delle immunoglobuline umanizzate dell'invenzione prodotte in sistemi procariotici mediante coniugazione con polietilenglicole (PEG).

Altri organismi unicellulari come i lieviti possono essere utilizzati per l'espressione. L'ospite d'elezione e' il *Saccharomyces*, usando vettori adatti dotati di sequenze di controllo dell'espressione, di terminazione e di origine di replicazione.

Anche colture di cellule di insetto possono essere usate per produrre le immunoglobuline umanizzate dell'invenzione, tipicamente utilizzando cellule di *Drosophila* S2 trasfettate in modo stabile o cellule di *Spodoptera frugiperda* con il sistema d'espressione basato sul Baculovirus (Putlitz *et al.*, 1990).

Piante e culture di cellule vegetali possono essere usate per l'espressione delle immunoglobuline umanizzate dell'invenzione.

(Larrick & Fry, 1991; Benvenuto *et al.*, 1991; Durin *et al.*, 1990; Hiatt *et al.*, 1989).

Tuttavia in tutti questi casi non è possibile ottenere il corretto tipo di glicosilazione necessario a garantire la funzione di effettore nell'attivazione del sistema immunitario umano. A questo scopo è possibile utilizzare colture tissutali di cellule di mammifero per esprimere i polipeptidi della presente invenzione in forma integrale di IgG1, dimostratesi l'isotipo più efficace fra le immunoglobuline seriche nell'induzione della risposta immunitaria (Winnacker, 1987). Va sottolineato che, considerando che l'isotipo determina il potenziamento di un anticorpo, generalmente l'isotipo IgG1 è usato per scopo terapeutici (dato che induce la risposta immune sia cellulo-mediata che mediata dal sistema del complemento), mentre l'isotipo IgG4 è utilizzato per applicazioni diagnostiche (Riechmann *et al.*, 1988). In particolare vengono preferite le cellule di mammifero, considerando il gran numero di linee cellulari ospite sviluppate per la secrezione di immunoglobuline intatte fra cui le linee cellulari CHO, diverse linee di COS, le cellule HeLa, linee cellulari di mieloma (NS0, SP/2, YB/0 e P3X63.Ag8.653), cellule B trasformate o ibridomi. Vettori di espressione per queste cellule possono includere sequenze per il controllo dell'espressione, quali un'origine di replicazione, un promotore, un enhancer (Queen *et al.*, 1986), e le sequenze necessarie per il legame del ribosoma, per lo splicing dell' RNA e per la poliadenilazione, e sequenze per la terminazione trascrizionale. Le sequenze di controllo dell'espressione d'elezione sono promotori derivanti dai geni delle immunoglobuline e da virus, quali SV40, Adenovirus, Bovine Papilloma Virus, Cytomegalovirus



e simili. Generalmente nel vettore d'espressione e' incluso un marcatore selezionabile, come la resistenza alla neomicina.

Per l'espressione di anticorpi umanizzati è preferibile coltivare le linee cellulari di mammifero con un terreno senza siero. Per esempio la linea cellulare HUDREG-55 può essere facilmente cresciuta in Serum-Free and Protein-Free Hybridoma Medium Cat. No. S-2897 from Sigma (St. Louis, Mo.).

I geni codificanti le immunoglobuline umanizzate dell'invenzione possono essere usati per generare animali transgenici non umani, che esprimono le immunoglobuline umanizzate di interesse, tipicamente in un fluido corporeo recuperabile come il latte o il siero. Tali transgeni comprendono la sequenza polinucleotidica codificante le immunoglobuline umanizzate operativamente legata a un promotore, solitamente con una sequenza enhancer, come quella dell'immunoglobulina di roditore oppure il promotore/enhancer del gene della caseina (Buhler *et al.*, 1990; Meade *et al.*, 1990). I transgeni possono essere trasferiti nelle cellule o embrioni mediante costrutti per ricombinazione omologa. Fra gli animali non umani d'uso: topo, ratto, pecora, bovino e capra (WO91/08216).

Una volta espresse come anticorpi intatti, i loro dimeri, le singole catene leggere e pesanti, o in altre forme le immunoglobuline della presente invenzione possono essere purificate seguendo procedure standard, fra cui precipitazione con ammonio solfato, colonne d'affinità, cromatografia su colonna (Scopes, 1982). Per applicazioni farmaceutiche sono necessarie immunoglobuline sostanzialmente pure, con omogeneità minima tra 90 e 95%, ma preferibilmente tra 98 e 99%

o anche maggiore. Una volta purificate, parzialmente o all'omogeneità desiderata, le proteine possono essere usate per uso terapeutico (anche in maniera extra corporea), per uso diagnostico (imaging per la diagnostica di tumori o del morbo di Alzheimer) o per sviluppare o eseguire saggi biochimici, colorazioni immunofluorescenti e simili (vedi, in generale, Lefkovits e Pernis, 1979 e 1981).

Un'applicazione farmaceutica della presente invenzione riguarda l'uso dell'immunoglobulina umanizzata MNAC13 in forma di immunotossina al fine di eliminare le cellule che esprimono TrkA (nel caso dei tumori a pancreas e prostata). Le immunotossine sono caratterizzate da due componenti e sono particolarmente adatte a uccidere particolari cellule sia *in vitro* che *in vivo*. Una componente dell'agente citotossico che generalmente è letale per una cellula se assorbito o se interagisce con la superficie cellulare. La seconda componente fornisce il mezzo per indirizzare l'agente tossico a uno specifico tipo cellulare bersaglio, come ad esempio le cellule che esprimono l'epitopo del recettore TrkA. Le due componenti sono legate chimicamente l'una con l'altra mediante una qualsiasi della gran varietà di procedure chimiche disponibili. Ad esempio quando l'agente citotossico è una proteina e la seconda componente è un'immunoglobulina intatta il legame può essere mediato da agenti crossleganti e eterobifunzionali (SPDP, carbodiimmide, glutaraldeide). Alternativamente le due componenti possono venire legate geneticamente (Chaudhary *et al.*, 1989). La produzione di varie immunotossine è riportata da Thorpe *et al.* (1982).

Un gran numero di agenti citotossici sono adatti all'applicazione come immunotossine. Gli agenti citotossici possono includere radionuclidi

come iodio 131 o altri isotopi dello iodio, ittrio 90, renio 188 e bismuto 212 o altri isotopi che emettono particelle alfa; un gran numero di farmaci chemioterapici come la vindesina, il meto-trexato, l'adriamicina e la cisplatina; e proteine citotossiche, quali proteine che inibiscono e ribosomi (come la proteina antivirale pokeweed, l'esotossina A di *Pseudomonas* e la tossina difterica, la ricina A e la clavina di origine vegetale) o agenti attivi a livello di superficie cellulare (come gli enzimi fosfolipasi quali la fosfolipasi C) -eds. Baldwin and Byers, 1985; U.S. Ser. No. 07/290,968; Olsnes and Phil, 1982. V'è sottolineato che la regione citotossica dell'immunotossina può essere essa stessa immunogena e di conseguenza limitare l'utilità clinica della proteina di fusione nel caso di terapie croniche o a lungo termine. Un'alternativa per evitare il problema dell'immunogenicità della tossina, consiste nell'esprimere in fusione con il dominio di legame dell'anticorpo una proteina in grado di interagire con il DNA e legare a questa proteina di fusione il vettore d'espressione che contiene la cassetta d'espressione della tossina. Infatti le numerose cariche positive della protamina, una proteina umana che lega il DNA, possono interagire in modo stabile con le cariche negative del DNA, generando un partner di fusione per l'anticorpo di carica neutra, molto più stabile e meno immunogeno della tossina stessa. Dopo internalizzazione del complesso anticorpo-plasmide via endocitosi mediata da recettore, l'espressione della tossina provoca la morte della cellula. Inoltre è possibile aumentare ulteriormente la selettività nei riguardi della cellula bersaglio da eliminare inserendo nella cassetta di espressione della tossina promotori inducibili o cellulo-specifici. Questo appoggio è volto a

massimizzare l'eliminazione selettiva delle cellule tumorali minimizzando gli effetti collaterali di tossicità (Chen *et al.*, 1995).

La componente che indirizza l'immunotossina al bersaglio corretto include l'immunoglobulina umanizzata MNAC13 della presente invenzione sotto forma di immunoglobulina intatta oppure del frammento di legame ovvero come frammento Fab o Fv. Tipicamente gli anticorpi nelle immunotossine sono dell'isotipo umano IgM o IgG, ma anche altre regioni costanti possono essere utilizzate.

Gli anticorpi e le composizioni farmaceutiche di questi invenzione sono particolarmente utili per somministrazione, seguendo qualsiasi metodologia efficace a indirizzare gli anticorpi a livello del tessuto coinvolto nella patologia. Ciò include (ma non è limitato a): via intraperitoneale, intramuscolare, intravenosa, sottocutanea, intratracheale, orale, enterale, parenterale, intranasale o dermale. Gli anticorpi dell'invenzione possono essere somministrati tipicamente per applicazioni locali mediante iniezione (intraperitoneale o intracranica - tipicamente in un ventricolo cerebrale- o intrapericardica o intraborsale) di formulazioni liquide o per ingestione delle formulazioni solide (sotto forma di pastiglie, tavolette, capsule) o delle formulazioni liquide (sotto forma di emulsioni e soluzioni). Le composizioni per somministrazione parenterale comprendono comunemente una soluzione dell'immunoglobulina disciolta in una soluzione compatibile, preferibilmente acquosa. La concentrazione dell'anticorpo in queste formulazioni può variare da meno del 0.005% fino a 15-20% e viene selezionata principalmente in base ai volumi del liquido, alla viscosità, etc. e a seconda del particolare modo di somministrazione scelto.



Alternativamente gli anticorpi possono essere preparati per la somministrazione in forma solida. Gli anticorpi possono venire combinati con diverse sostanze inerti o eccipienti, che possono includere leganti quali cellulosa microcristallina, gelatina o gomma arabica; recipienti quali lattosio o amido; agenti quali acido alginico, Primogel o amido di mais; lubrificanti come magnesio stearato, diossido di silicone colloidale; dolcificanti come saccarosio o saccarina; o aromi, quali menta o metil sialicilato. Altri sistemi di somministrazione farmaceutica includono idrogel, idrossimetilcellulosa, liposomi, microcapsule, microemulsioni, microsfele, etc. Iniezioni locali direttamente nei tessuti affetti da malattia come ad esempio i tumori è metodo preferenziale per la somministrazione degli anticorpi della presente invenzione.

Gli anticorpi dell'invenzione possono venire congelati o liofilizzati e ricostituiti subito prima dell'uso in un tampone adatto. Considerando che la liofilizzazione e la ricostituzione possono determinare una perdita variabile nell'attività dell'anticorpo (per immunoglobuline convenzionali gli anticorpi di classe IgM tendono ad avere una perdita di attività più consistente rispetto ad anticorpi di classe IgG), i livelli di somministrazione devono essere calibrati per compensare questo fatto.

Per la loro elevata capacità bloccante le composizioni contenenti gli anticorpi della presente invenzione possono essere somministrate per trattamenti profilattici e/o terapeutici per prevenire o ridurre la componente infiammatoria associata a situazioni patologiche o il dolore cronico, in particolare viscerale cronico (associato a disordini fisiologici,

come dismenorrea, dispepsia, reflusso gastrointestinale, pancreatite, visceralgia o sindrome dell'intestino irritabile).

Nelle applicazioni profilattiche, composizioni contenenti anticorpi della presente invenzione sono somministrate a pazienti che non soffrono ancora di una particolare patologia per aumentare la loro resistenza.

Gli anticorpi della presente invenzione forniscono anche un metodo per ridurre il volume dei tumori alla prostata o al pancreas e per prevenire ulteriore crescita tumorale o ridurre il tasso di crescita del tumore. Questo effetto può essere mediato da entrambi gli anticorpi umanizzati della presente invenzione in quanto estremamente efficaci nella neutralizzazione dell'interazione fra NGF e TrkA necessari a sostenere in modo autocrino o paracrino la crescita e la progressione tumorale. Inoltre la forma umanizzata di MNAC13 interagisce con un recettore di membrana e quindi può essere utilizzato anche per la diretta eliminazione delle cellule neoplastiche in quanto in grado di attivare la risposta immune dell'ospite (se somministrato in forma di IgG1) o di veicolare un agente citotossico localizzandolo a livello della massa cancerosa (se somministrato in forma di immunotossina).

La loro somministrazione nel sito del tumore avviene preferibilmente attraverso iniezione diretta e localizzata nel tessuto o nei pressi del sito del tumore. Per somministrazione sistemica le dosi variano fra 0.05 mg/kg al giorno e 500 mg/kg al giorno, sebbene vengono preferiti dosaggi nella regione più bassa dell'intervallo in quanto più facili da somministrare. I dosaggi possono venire calibrati ad esempio a garantire un particolare livello nel plasma dell'anticorpo (nell'intervallo di circa 5-30 mg/ml, preferibilmente fra 10-15 mg/ml) e mantenere tale

livello per un dato periodo di tempo fino a i risultati clinici raggiunti. Gli anticorpi umanizzati dovrebbero essere eliminati molto più lentamente e chiedono dosaggi minori a mantenere un livello efficace nel plasma; inoltre considerata l'elevata affinità, la somministrazione risulta meno frequente e meno consistente rispetto ad anticorpi con minore affinità. Il dosaggio terapeuticamente efficace di ciascun anticorpo può essere determinato durante il corso del trattamento sulla base della riduzione nel volume del tumore o del tasso di crescita del tumore o idealmente dalla completa scomparsa dello stato patologico canceroso. Metodi efficaci per misurare o valutare lo stadio del tumore pancreatico o prostatico si basano sulla misura dell'antigene specifico della prostata (PSA) nel sangue, sulla misura del tempo di sopravvivenza per il tumore al pancreas, sulla misura del ritardo o dell'inibizione della diffusione per metastasi nel caso di entrambi tumori.

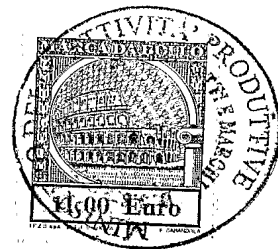
Per l'iniezione diretta a livello del sito del tumore, il dosaggio dipende da diversi fattori inclusi il tipo, lo stadio e il volume del tumore insieme a molte altre variabili. A seconda del volume del tumore dosi terapeutiche tipiche possono variare fra iniezioni di 0.01 mg/mm e 10 mg/mm per delle iniezioni possono essere praticate con la frequenza necessaria. Un altro metodo per valutare l'efficacia di un particolare trattamento è valutare l'inibizione del recettore TrkA ad esempio misurandone l'attività mediante saggio ELISA (Angeles *et al.*, 1996).

È importante sottolineare che, oltre che come bersaglio terapeutico, TrkA si configura anche come un bersaglio diagnostico per imaging in vivo, fra cui per imaging di tumori TrkA positivi (come marcatore positivo o negativo a seconda della tipologia e dell'origine del tumore) e imaging

su cellule del proencefalo basale (come marcatore precoce di insorgenza del morbo di Alzheimer). L'anticorpo umanizzato MNAC13 della presente invenzione può inoltre trovare un'ampia varietà di applicazioni *in vitro* (ELISA, IRMA, RIA, immunoistochimica).

Per scopi diagnostici gli anticorpi possono essere sia marcati che non marcati. Anticorpi non marcati possono essere usati in combinazione con altri anticorpi marcati (anticorpi secondari), che sono reattivi contro anticorpi umanizzati, o umani (come ad esempio anticorpi specifici per le regioni costanti delle immunoglobuline umane). In alternativa di anticorpi possono essere marcati direttamente. Può essere utilizzata un'ampia varietà di marcature, come ad esempio radionuclidi, fluorofori, coloranti, enzimi, substrati enzimatici, fattori di enzimatici, inibitori enzimatici, ligandi (in particolare apteni), etc. Nel settore sono disponibili numerosi tipi di saggi immunologici.

In particolare per applicazioni diagnostiche di tipo imaging all'anticorpo va coniugato un agente rilevabile ovvero marcato in modo isotopico (usando radioisotopi di iodio, indio, tecnezio) o paramagnetico (atomi o ioni paramagnetici, quali elementi di transizione, degli attinidi e delle terre rare; in particolare manganese II, rame II e cobalto II) come descritto da Goding (1986) e Paik *et al.* (1982). Le procedure di imaging prevedono l'iniezione intravenosa, intraperitoneale o sottocutanea (nelle zone di drenaggio linfatico per identificare metastasi ai linfonodi) e utilizzano detectors in grado di rilevare le emissioni dei radionuclidi (come β counter a scintillazione) nel caso dell'immuoscintillografia; se invece viene usata una marcatura paramagnetica viene usato uno spettrometro NMR (Nuclear Magnetic Resonance).



L'invenzione verrà ora descritta in sue forme di realizzazione non limitative, in riferimento alle seguenti figure:

Figura 1: A) Analisi mediante gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE 12%) e colorazione con Blu Coomassie del risultato della purificazione del frammento Fab dell'anticorpo MNAC13 (pozzetto 1: campione di anticorpo MNAC13 digerito proteoliticamente con papaina; pozzetto 2: frazione legata alla resina di scambio ionico DEAE Sephacell ed eluita con NaCl 250mM; pozzetto 3: pesi molecolari; pozzetto 4: frammento Fab dell'anticorpo MNAC13 purificato e concentrato); B) Tipico cristallo del frammento Fab dell'anticorpo MNAC13 C) Spettro di diffrazione ad alta risoluzione ottenuto con un cristallo del frammento Fab dell'anticorpo MNAC13; D Grafico di Ramachandran degli angoli di torsione della catena principale dei domini pesante e leggero del frammento Fab dell'anticorpo MNAC13.

Figura 2: A) Analisi mediante gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE 12%) e colorazione con Blu Coomassie del risultato della purificazione del frammento Fab dell'anticorpo α D11 (pozzetto 1: campione di anticorpo α D11 digerito proteoliticamente con papaina; pozzetto 2: frammento Fab dell'anticorpo α D11 purificato e concentrato; pozzetto 3: pesi molecolari); B) Tipico cristallo del frammento Fab dell'anticorpo α D11 C) Spettro di diffrazione ad alta risoluzione ottenuto con un cristallo del frammento Fab dell'anticorpo α D11; D) Grafico di Ramachandran degli angoli di torsione della catena principale dei domini pesante e leggero del frammento Fab dell'anticorpo α D11.

Figura 3: A) B) C) D) Distribuzioni degli anticorpi umanizzati o di origine umana (denominati utilizzando i codici PDB delle loro strutture cristallografiche) in funzione delle tre variabili analizzate; E) F) Divergenze degli anticorpi umanizzati o di origine umana dall'ipotetico valore ottimale di MNAC13 (calcolate sia considerando il grado di identità e di omologia complessive **–in blu–** che livello di framework **–in magenta–**) G) Allineamento strutturale con il frammento Fv di MNAC13 delle rispettive regioni degli anticorpi umanizzati o di origine umana, selezionati in base al grado di identità e omologia con l'anticorpo murino e al grado di risoluzione dei dati strutturali disponibili; H) I) Allineamento strutturale con il frammento Fv di MNAC13 (rappresentato in ciano) della rispettiva regione dell'anticorpo umanizzato selezionato 1AD0~ (rappresentato in rosso) in H); del modello dell' anticorpo risultante una volta effettuato il CDR grafting (rappresentato in giallo a livello del framework, in bianco a livello delle CDR) in I); L) Modello del frammento Fv dell'anticorpo umanizzato MNAC13 ottenuto a seguito dell'identificazione di retro mutazioni putative nel framework scelto (in verde sono rappresentati i residui di origine umana e in magenta i residui di origine murina).

Figura 4: A) B) C) D) Distribuzioni degli anticorpi umanizzati o di origine umana (denominati utilizzando i codici PDB delle loro strutture cristallografiche) in funzione delle tre variabili analizzate; E) F) Divergenze degli anticorpi umanizzati o di origine umana dall'ipotetico valore ottimale di α D11 (calcolate sia considerando il grado di identità e di omologia complessive **–in blu–** che livello di framework **–in magenta–**) G) Allineamento strutturale con il frammento Fv di α D11 delle

rispettive regioni degli anticorpi umanizzati o di origine umana, selezionati in base al grado di identità e omologia con l'anticorpo murino e all'elevata risoluzione dei dati strutturali disponibili; H) I) Allineamento strutturale con il frammento Fv di α D11 (rappresentato in ciano) della rispettiva regione dell'anticorpo umanizzato selezionato 1JPS (rappresentato in **rosso**) H); del modello dell' anticorpo risultante una volta effettuato il CDR grafting (rappresentato **in giallo** a livello del framework, **in bianco** a livello delle CDR) I); L) Modello del frammento Fv dell'anticorpo umanizzato α D11 ottenuto a seguito dell'identificazione di retro mutazioni putative nel framework scelto (in ciano sono rappresentati i residui di origine umana e in viola i residui di origine animale).

Figura 5: Allineamento delle strutture primarie delle regioni variabili della catena pesante (A) e della catena leggera (B) rispettivamente di MNAC13, dell'anticorpo umanizzato selezionato per l'umanizzazione (1AD0), della forma umanizzata di MNAC13 a seguito del CDR grafting sul framework di 1AD0 e delle retro-mutazioni e mutazioni descritte (Hum MNAC13). Le CDR sono evidenziate nella sequenza della forma umanizzata delle due catene di MNAC13 mediante carattere sottolineato.

Figura 6: Allineamento delle strutture primarie delle regioni variabili della catena pesante (A) e della catena leggera (B) rispettivamente di α D11, dell'anticorpo umanizzato selezionato per l'umanizzazione (1JPS), della forma umanizzata di α D11 a seguito del CDR grafting sul framework di 1JPS e delle retro-mutazioni e mutazioni descritte (Hum α

D11). Le CDR sono evidenziate nella sequenza della forma umanizzata delle due catene di α D11 mediante carattere sottolineato.

Figura 7: A) sequenza nucleotidica del cDNA della regione variabile della catena pesante della forma murina di MNAC13, B) sequenza nucleotidica del cDNA della regione variabile della catena leggera della forma murina di MNAC13, C) e E) sequenza degli oligonucleotidi disegnati per ottenere la forma umanizzata della regione variabile della catena pesante di MNAC13 per mezzo della tecnica di overlap-assembly PCR, riportate insieme alla corrispondente traduzione in sequenza amminoacidica, D) e F) sequenza degli oligonucleotidi disegnati per ottenere la forma umanizzata della regione variabile della catena leggera di MNAC13 per mezzo della tecnica di overlap-assembly PCR, riportate insieme alla corrispondente traduzione in sequenza amminoacidica.



Figura 8: A) sequenza nucleotidica del cDNA della regione variabile della catena pesante della forma di ratto di α D11, B) sequenza nucleotidica del cDNA della regione variabile della catena leggera della forma di ratto di α D11, C) e E) sequenza degli oligonucleotidi disegnati per ottenere la forma umanizzata della regione variabile della catena pesante di α D11 per mezzo della tecnica di overlap-assembly PCR, riportate insieme alla corrispondente traduzione in sequenza amminoacidica, D) e F) sequenza degli oligonucleotidi disegnati per ottenere la forma umanizzata della regione variabile della catena leggera di α D11 per mezzo della tecnica di overlap-assembly PCR, riportate insieme alla corrispondente traduzione in sequenza amminoacidica.

Figura 9: Mappe dei plasmidi utilizzati per il clonaggio delle sequenze delle regioni variabili umanizzate di entrambi gli anticorpi ottenute mediante overlap-assembly PCR. A) *pVLexpress* per il dominio variabile della catena leggera, B) *pVHexpress* per il dominio variabile della catena pesante, C) plasmide risultante dal clonaggio in *pVLexpress* della regione variabile della catena leggera di ogni anticorpo umanizzato, D) costrutti alternativi ottenuti a seguito del clonaggio in *pVHexpress* della regione variabile della catena pesante di ogni anticorpo umanizzato: 1) per l'espressione in forma di immunoglobulina intatta IgG1, 2) per l'espressione in forma di frammento Fab, 3) per l'espressione in forma di immunotossina.

Figura 10: Confronto dell'attività di legame dell'anticorpo MNAC13 in forma chimerica e in forma umanizzata mediante saggio ELISA, effettuato immobilizzando su plastica TrkA in forma di immunoadesina: A) confronto fra diluizioni seriali di surnatanti di cellule COS transfettate, successivamente concentrati; B) confronto fra diluizioni seriali di surnatanti di cellule COS transfettate purificati mediante proteina G sepharose.

Figura 11: Saggio dell'attività di legame dell'anticorpo α D11 in forma umanizzata mediante saggio ELISA, effettuato immobilizzando su plastica NGF.

RISULTATI

STRUTTURE A RAGGI X DEL FRAMMENTO Fab DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI MNAC13 e α D11

Entrambi gli anticorpi monoclonali sono stati ottenuti e purificati secondo procedure standard. Le immunoglobuline MNAC13 IgG1 and

α D11 IgG2a sono state espresse nel surnatante mediante coltura di cellule di ibridoma e concentrati mediante precipitazione con ammonio solfato 29% seguita da dialisi in PBS. Entrambe le immunoglobuline sono state purificate mediante cromatografia d'affinità usando una colonna di Protein G Sepharose (Pharmacia).

A seguito di dialisi in tampone fosfato 10 mM pH 7, EDTA 20 mM usando membrane Spectra-Por 12/14K (Spectrum) a 4° C, ciascun campione è stato concentrato mediante unità da ultrafiltrazione Centricon 50KDa (Amicon) e incubato con 13mM Cys e trattato con papaina immobilizzata (Pierce) (con un rapporto enzima : substrato di 1:15) per 5 h at 37° C. La procedura di purificazione dei rispettivi frammenti Fab si diversifica pur essendo sempre basata su cromatografia a scambio ionico.

Nel caso di MNAC13 a seguito di dialisi contro Tris HCl 100mM pH 8.0, è stato possibile eliminare i frammenti Fc attraverso una colonna DEAE-Sephacel (Pharmacia) equilibrata con lo stesso tampone. FabMNAC13 è stato raccolto nel volume escluso mentre i frammenti Fc e una frazione di IgG1 non digerite sono state eluiti con 250mM NaCl. Il frammento Fab è stato separato dalle IgG1 non digerite mediante gel filtrazione su una colonna Superdex G75 (Pharmacia) equilibrata con Tris HCl 100mM pH 8.0, NaCl 150mM . L'omogenità e la purezza delle frazioni è stata controllata mediante separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide al 12% seguita da colorazione con Coomassie (Figura 1A). La concentrazione della proteina purificata è stata determinata mediante saggio Lowry (Bio-Rad). Da 1l di surnatante di ibridoma è

stato possibile ottenere fino a 3 mg di MNAC13 Fab (con purezza superiore al 99%).

Per quanto riguarda la purificazione del frammento Fab dell'anticorpo α D11, il campione trattato con papaina è stato dializzato contro tampone fosfato 10mM pH 7.8. I frammenti Fc sono stati eliminati attraverso una colonna DEAE-Sephacel (Pharmacia) equilibrata con questo stesso tampone. Il frammento Fab di α D11 è stato raccolto nel volume escluso, mentre i frammenti Fc e una frazione di IgG2a non digerite sono state eluite con tampone fosfato 250mM pH 6.8. Il frammento Fab è stato separato dalle IgG2a non digerite mediante gel filtrazione su una colonna Superdex G75 (Pharmacia) equilibrata con tampone fosfato 10mM pH 7.8, NaCl 150mM . L'omogenità e la purezza delle frazioni è stata controllata mediante separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide al 12% seguita da colorazione con Coomassie (Figura 2A). La concentrazione della proteina purificata è stata determinata mediante saggio Lowry (Bio-Rad). Da 1l di surnatante di ibridoma è stato possibile ottenere fino a 6 mg di α D11 Fab (con purezza superiore al 99%).

Sia il frammento Fab dell'anticorpo MNAC13 purificato in 10mM Tris pH 8.0, 50mM NaCl, che il frammento Fab dell'anticorpo α D11 purificato in 10mM Na fosfato pH 7.8 and 50mM NaCl sono stati concentrati a 5-10 mg/ml mediante unità per ultrafiltrazione Centricon 30KDa (Amicon). Gli esperimenti di cristallizzazione sono stati effettuati seguendo il metodo hanging-drop a 16°C. seguendo un approccio di combinazione fattoriale (Jancarik & Kim, 1991) usando Crystal Screen I and II

(Hampton Research -Laguna Niguel, CA, USA-) e Screening Kit (Jena BioSciences).

Gocce di 2 μ l del campione proteico concentrato sono state aggiunte a un egual volume della soluzione contenente l'agente precipitante ed equilibrate mediante diffusione con una soluzione nel reservoir (0.7 ml) in 24 well Linbro plates.

Per quanto riguarda il frammento Fab dell'anticorpo MNAC13 il risultato iniziale piu' promettente, ottenuto con eguali volumi di proteina e precipitante contenente 2M ammonio solfato, 5% v/v isopropanolo (Crystal Screen II, Reagente #5), è stato ottimizzato fino a ottenere cristalli che crescono in circa una settimana, analoghi a quello riportato in Figura 1B.

Per quanto riguarda il frammento Fab dell'anticorpo α D11 il risultato iniziale piu' promettente, ottenuto usando eguali volumi di proteina e precipitante contenente 20% PEG4000, 0.6M NaCl, 100mM MES pH 6.5 (Kit numero 4, soluzione C2), ha richiesto un lungo processo di ottimizzazione modificando la composizione dell'agente precipitante a 20% PEG4000, 0.6M NaCl, 100mM BTP pH 5.5 e i rapporti tra proteina e soluzione precipitante (1.5 : 1) fino a ottenere cristalli che crescono in circa una settimana, analoghi a quello riportato in Figura 2B.

In entrambi i casi è stato raccolto un set di dati iniziale a bassa risoluzione sulla linea di diffrazione XRD1 del sincrotrone ELETTRA (Trieste, Italia) e in seguito un secondo piu' completo set di dati a piu' alta risoluzione sulla linea di diffrazione ID14-EH1 del sincrotrone ESRF (Grenoble, Francia). I cristalli sono stati congelati sotto flusso di azoto liquido mediante il sistema di raffreddamento della Oxford Cryosystems



(Oxford, UK), usando nel caso del frammento Fab dell'anticorpo MNAC13 una soluzione contenente 2.2 M ammonio solfato, 6% v/v isopropanolo e 20% v/v glicerolo come crioprotettore. Uno spettro di diffrazione ad alta risoluzione rappresentativo per ciascuna proteina è riportato in Figure 1B e 2B.

Tutti e quattro i set di dati di diffrazione a raggi X sono stati processati, indicizzati, integrati e successivamente scalati usando i programmi *DENZO* e *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997) rispettivamente, mentre il package *CCP4* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) è stato usato per la riduzione dei dati. Le statistiche per la raccolta e il processamento dei dati ad alta e a bassa risoluzione dei cristalli del frammento Fab dell'anticorpo MNAC13 sono riportati nella seguente tabella:

Fonte raggi X	ELETTRA	ESRF
Lunghezza d'onda (Å)	1.000	0.934
Detector	mar345	marCCD
Gruppo spaziale	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parametri della cella unitaria		
a (Å)	52.78	52.73
b (Å)	67.53	67.55
c (Å)	111.51	111.43
Mosaicità (°)	0.40	0.47
Intervallo di risoluzione (Å)	12.0 - 2.50	17.0 - 1.80
	(2.59 - 2.50)	(1.83-1.80)
No. misure	98688	414115
No. di riflessi osservati con I ≥ 0	56918	227914

No. riflessi unici con $I \geq 0$	14203 (1371)	38392 (1893)
Completezza (%)	99.5 (99.3)	99.5 (99.6)
Ridondanza	4.0 (4.0)	5.9 (4.9)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ dei dati misurati	9.4 (4.7)	8.2 (1.1)
R_{sym} (%)	5.7 (15.2)	6.3 (39.8)

Analogamente la seguente tabella riassume le statistiche per la raccolta e il processamento dei dati ad alta e a bassa risoluzione dei cristalli del frammento Fab dell'anticorpo α D11:

Fonte raggi X	ELETTRA	ESRF
Lunghezza d'onda (Å)	1.000	0.934
Detector	marCCD	marCCD
Gruppo spaziale	P1	C2
Parametri della cella unitaria		
a (Å)	42.685	114.801
b (Å)	50.626	69.354
c (Å)	102.697	64.104
α (°)	81.977	90
β (°)	89.116	117.02
γ (°)	85.957	90
Mosaicità (°)	0.44	0.40
Intervallo di risoluzione (Å)	47.6 - 2.57	17.0 - 1.70
	(2.8 - 2.7)	(1.75-1.70)
No. misure	124456	492594
No. di riflessi osservati con $I \geq 0$	74241	399184

No. riflessi unici con $I \geq 0$	23413 (2162)	47951 (3198)
Completezza (%)	98.2 (92.4)	97.2 (78.4)
Ridondanza	5.7 (5.2)	6.7 (7.5)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$ dei dati misurati	29.6 (6.7)	9.5 (2.1)
R_{sym} (%)	11.0 (33.5)	5.8 (27.8)

Dove i valori in parentesi si riferiscono alla shell a più alta risoluzione.

Considerato l'elevato numero di strutture di frammenti Fab disponibili, il metodo più agevole per determinare la struttura di entrambe le proteine è stato quello della Sostituzione Molecolare. In una ricerca nel Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000) per strutture omologhe, i criteri di scelta hanno privilegiato la combinazione fra risoluzione comparabile e più elevato livello di identità di sequenza. Su queste basi sono stati scelti rispettivamente

per MNAC13: 1BM3: la struttura del complesso fra frammento Fab dell'immunoglobulina Opg2 Fab e il peptide da esso riconosciuto (Kodandapani *et al.*, 1999), risolta a una risoluzione di 2.0Å e dotato di un'identità di sequenza rispettivamente del 70 e 88% per la catena pesante e leggera.

per α D11: 1C1C, la struttura del complesso di frammenti Fab idiotipo-anti-idiotipo FabD1.3-FabE225 (Bentley *et al.*, 1990), risolta a una risoluzione di 2.5Å e dotato di un'identità di sequenza rispettivamente del 82 e 82,65% per la catena pesante e leggera.

La determinazione di entrambe le strutture è stata ottenuta mediante il metodo della Sostituzione Molecolare usando il programma *AMoRe* (Navaza, 1994), con i rispettivi modelli usando separatamente i domini

costanti e domini variabili considerata l'estrema variabilità dell'angolo formato dagli assi di pseudosimmetria binaria tra le regioni variabili e costanti. La soluzione ottenuta nella determinazione della struttura, del frammento Fab di MNAC13 a seguito di affinamento a corpo rigido è riportata nella seguente tabella :

Picco	α	β	γ	x	y	z	C_f	R_f	C_i	C_p
V	106.5	20.7	143.9	.1004	.0757	.04680				
C	94.5	13.9	173.3	.1684	.3073	.7355	53.7	39.8	54.8	32.4

Analogamente la soluzione ottenuta nella determinazione della struttura del frammento Fab di α D11 a seguito di affinamento a corpo rigido per il gruppo spaziale C2 è riportata nella seguente tabella:

Picco	α	β	γ	x	y	z	C_f	R_f	C_i	C_p
V	151.0	155.4	43.0	.1424	.0005	.449				
C	17.8	63.7	73.2	.3625	.9532	.1991	55.0	38.9	49.7	35.9

Dove V= dominio variabile

C= dominio costante

α, β, γ = angoli eulerei (°).

x,y,z = Translatione (frazionaria).

C_f = Correlazione delle ampiezze (x100).

R_f = Fattore R cristallografico (x100).

C_i = Correlazione delle intensità (x100).

C_p = Correlazione della funzione Patterson troncata (x100).



Il successivo affinamento delle due strutture è stato ottenuto mediante una procedura ciclica, comprendente due fasi alternate: costruzione manuale del modello usando il software interattivo per computer graphics "O" (Kleywegt and Jones, 1994); raffinamento posizionale e di fattori termici isotropi B usando protocolli automatici della CNS suite, Crystallography and NMR System (Brünger *et al.*, 1998). La procedura dopo alcune fasi di affinamento a corpo rigido, ha contemplato diverse cicli di affinamento. Una volta completato l'inserimento di tutte le mutazioni e delezioni per completare i modelli, si è proceduto alla localizzazione delle molecole d'acqua e degli eventuali ioni e ligandi. Alla fine mantenendo il modello piu' vicino possibile ai valori ideali in termini di restrizioni stereochemiche, e' stato effettuata l'ottimizzazione del peso posizionale weight w_a e del peso del fattore termico B r -weight. Le statistiche e i parametri finali che descrivono la qualità del modello ottenuto per il frammento Fab dell'anticorpo MNAC13 sono riassunti nella seguente tabella:

Numero di atomi di proteina	3244
Numero di atomi di solvente	351
Numero di ioni solfato	4
Numero di molecole di Tris	1
Numero di molecole di isopropanolo	1
Intervallo di risoluzione (Å)	39-1.778
Fattore R finale	19.35%
Fattore R_{free} finale (calcolato sul 10% dei dati)	23.22%

Deviazioni rms

<i>Distanze di legame (Å)</i>	0.008
-------------------------------	-------

Angoli di legame (°) 1.456

Angoli diedri (°) 27.29

Angoli impropri(°) 0.928

Fattore termico isotropo medio (Å²)

Proteina completa 23.55

Catena leggera 24.14

Catena pesante 22.99

Molecole d'acqua 31.95

Ioni (solfato) 55.94

Tris 46.06

Isopropanolo 32.60

Analogamente le statistiche e i parametri finali che descrivono la qualità del modello ottenuto per il frammento Fab dell'anticorpo αD11 sono riassunti nella seguente tabella:

Numero di atomi di proteina 3229

Numero di atomi di solvente 403

Numero di ioni cloruro 1

Intervallo di risoluzione (Å) 30-1.70

Fattore R finale 19.54%

Fattore R_{free} finale (calcolato sul 10% dei dati) 24.22%

Deviazioni rms

Distanze di legame (Å) 0.0096

Angoli di legame (°) 1.6571

Angoli diedri (°) 27.40

Angoli impropri(°) 1.048

Fattore termico isotropo medio (\AA^2)

Proteina completa	25.58
Catena leggera	24.14
Catena pesante	22.99
Molecole d'acqua	38.80
Ioni (cloruro)	20.58

Inoltre entrambi i modelli sono stati vagliati mediante analisi della geometria finale con la suite PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) come riportato nelle rispettive tabelle e nei rispettivi grafici di Ramachandran (Figure 1D e 2D).

USO DELLE STRUTTURE A RAGGI X DEL FRAMMENTO Fab DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI MNAC13 e α D11 NELLA SELEZIONE DI UN FRAMEWORK DI ORIGINE UMANA

Nella scelta del framework dell'anticorpo umano si è seguito l'approccio sopradescritto, che combina sul grado di identità tra l'anticorpo di origine murina e umana a livello di sequenza primaria al grado di similarità strutturale degli scheletri polipeptidici.

In particolare è stata selezionata una serie di possibili frameworks accettori di anticorpi di origine umana o umanizzati sulla base del più elevato livello sia di omologia che di identità delle strutture primarie mediante una ricerca nel database BLAST. Questa selezione è stata effettuata per entrambi gli anticorpi bloccanti sia considerando le intere regioni variabili degli anticorpi che restringendo la ricerca alle regioni del framework.

All'interno di ciascun gruppo di anticorpi selezionati sono stati considerati unicamente quelli per i quali sono disponibili dati strutturali a

risoluzione elevata o comunque confrontabile con quella delle strutture da noi ottenute (ovvero non superiore a 2.5\AA) effettuando una ricerca in PDB (Protein Data Bank). I rispettivi scheletri amminoacidici sono quindi stati sovrapposti mediante il software "superimpose" (Diederichs, 1995). Le Figure 3G e 4G mostrano il risultato dell'allineamento fra la regione Fv (rispettivamente di MNAC13 e di α D11) e le strutture terziarie degli scheletri di atomi di carbonio alfa degli anticorpi umanizzati o di origine umana, selezionati sulla base dell'ottimale allineamento delle strutture primarie con l'anticorpo da umanizzare e della elevata risoluzione dei dati strutturali disponibili.

Per valutare il grado di sovrapposizione di ogni singola struttura di origine umana o ingegnerizzata sia con MNAC13 che con α D11 e' stato calcolato l'RMS fra atomi di carbonio alfa costituenti i rispettivi scheletri amminoacidici, non considerando le coppie di atomi che abbiano un RMS superiore a 2\AA .

Nella selezione del framework ottimale per l'umanizzazione si configura in un problema a tre variabili, rappresentabile quindi nello spazio, sia che si associ all'allineamento strutturale il livello di omologia che il grado di identità'. Questo tipo di analisi e' stata condotta poi anche riducendo le regioni in esame nei due tipi di allineamento alle regioni dei rispettivi frameworks.

Come si puo' notare in Figure 3 e 4 le distribuzioni degli anticorpi considerati nello spazio delle tre variabili analizzate (rispettivamente valore dell'RMS, percentuali di atomi su cui l'RMS e' stato calcolato e un indice di similitudine fra strutture primarie, ovvero percentuale di identità complessiva -A-, di omologia complessiva -C-, di identità a



livello del framework –B-, di omologia a livello del framework –D-) sono fra di loro coerenti e consistenti per entrambi i casi considerati.

Inoltre confrontando queste distribuzioni con la posizione ottimale nello spazio delle tre variabili che occuperebbe ciascun anticorpo se fosse di origine umana, e' possibile individuare chiaramente l'anticorpo di origine umana che piu' si avvicina a livello di struttura primaria e terziaria a questa posizione ideale. Per razionalizzare nel caso di entrambi gli anticorpi, questo risultato in ciascuna delle quattro analisi sono state calcolate le divergenze rispetto all'ipotetica posizione ottimale per ciascuna posizione degli anticorpi umanizzati o di origine umana considerati (Figura 3E e 3F per MNAC13 e Figura 4E e 4F per α D11). Anche in questo caso i risultati sono coerenti e confermano le indicazioni precedenti.

Sulla base di questo metodo di selezione sono stati scelti due diversi anticorpi umanizzati come framework accettore nel successivo processo di CDR grafting per l'umanizzazione di dei due anticorpi neutralizzanti l'interazione NGF/TrkA. In particolare le Figure 3H e 4H mostrano l'allineamento strutturale a livello della regione Fv dei due anticorpi bloccanti con il rispettivo anticorpo umanizzato selezionato, ovvero, utilizzando i codici PDB, 1JPS per α D11 e 1AD0 per MNAC13. Le Figure 3I e 4I confrontano la stessa regione dell'anticorpo murino con il modello dello stesso anticorpo a seguito del CDR grafting.

Una volta definite le CDR, sono state identificate le classi canoniche (definite da Chothia e Lesk) cui appartengono e in seguito mantenere i residui canonici nell'anticorpo umanizzato: per ciascun anticorpo sono state evidenziate mediante carattere sottolineato in Figura 5 e Figura 6.

Riguardo la successiva analisi delle retromutazioni da introdurre, per mantenere i residui che mediano l'interazione fra la catena leggera e la catena pesante dei domini variabili sono state inserite le seguenti retromutazioni per mantenere l'interfaccia fra i due domini:

L46 e H35, H37 per MNAC13

L34, L46, L92 e H35 per α D11.

Inoltre per mantenere le caratteristiche della zona di Vernier sono state effettuate le seguenti retromutazioni:

L98 per MNAC13

H71 per α D11 (che comunque riguardano sostituzioni per residui amminoacidici rappresentati nelle sequenze consenso umane).

Succesivamente a seguito del confronto con le principali sequenze consenso di immunoglobuline umane, sono state effettuate le seguenti retro-mutazioni:

L1, L2, L13, L50, L73, L104 e H24, H48, H49, H73, H76, H82B, H87, H90, H93 per MNAC13

L56 per α D11

Inoltre sempre sulla base delle sequenze consenso di immunoglobuline umane sono state introdotte nella forma umanizzata di MNAC13 le seguenti mutazioni che inseriscono residui conservati nell'uomo al posto dei residui inusuali presenti sia nel framework donatore che accettore:

L42 (L \rightarrow Q), L83 (I \rightarrow V) e H83 (Q \rightarrow R), H89 (I \rightarrow V).

Per lo stesso motivo è stata introdotta nella forma umanizzata di α D11 la seguente mutazione: H67 (V \rightarrow F).

Le rispettive coppie di strutture cristallografiche sono state modificate, prima effettuando il grafting delle CDR di origine animale nei framework umanizzati. In seguito sono state introdotte tutte le mutazioni e retro-mutazioni sopradescritte. Le strutture modificate sono state quindi assemblate in immunoglobuline composite. I modelli risultanti sono stati raffinati mediante minimizzazione dell'energia meccanica (in termini di angoli di torsione, angoli e distanze di legame) utilizzando il campo di forze.

UMANIZZAZIONE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI MNAC13 e α D11

Una volta selezionato l'anticorpo umanizzato donatore del framework per realizzare il CDR grafting di MNAC13 si procede al design delle rispettive regioni variabili, che combinano le CDR murine di MNAC13 con il framework dell'anticorpo umanizzato modificato secondo le mutazioni riportate in precedenza. Una procedura analoga è stata seguita per α D11. Sostanzialmente è possibile ottenere le due regioni variabili umanizzate mediante una procedura basata sulla metodologia di *overlap assembly PCR*, usando oligonucleotidi di circa 80 basi, che alternano il filamento senso e antisenso con i consecutivi sovrapposti per una lunghezza di 20 basi in modo da consentire la formazione di molecole parzialmente a doppio filamento a seguito dell'ibridazione (Figure 7B e 8B). Dopo aver colmato le discontinuità tramite la Vent polimerasi, il doppio filamento viene amplificato per PCR usando come inneschi due corti oligonucleotidi recanti le sequenze al 5' del doppio filamento stesso insieme a siti di restrizione adatti al successivo clonaggio direzionale (rispettivamente ApaLI/BglII per il clonaggio del

dominio variabile della catena leggera e BssHII/BstEII per il clonaggio del dominio variabile della catena pesante), previa digestione con rispettivi enzimi di restrizione, nel plasmide *pVLexpress* per il dominio variabile della catena leggera (Figura 9A) e nel plasmide *pVHexpress* per il dominio variabile della catena pesante (Figura 9B). Questi vettori consentono di esprimere in fusione con le sequenze clonate i domini costanti di origine umana rispettivamente C κ e CH1, CH2 e CH3. Mediante questi vettori è quindi possibile esprimere entrambi gli anticorpi sotto forma di molecole IgG1 (Figura 9C e 9D1) in linee cellulari umane come quelle elencate in precedenza.

Per ottenere entrambi gli anticorpi umanizzati in forma di frammenti Fab è sufficiente intervenire unicamente sul vettore in cui è clonata la catena pesante. In particolare è possibile sostituire l'intera parte costante con il solo dominio CH1 amplificato per PCR utilizzando inneschi specifici dotati di siti di restrizione agli estremi per il clonaggio direzionale *SacII-XbaI* (come riportato in Figura 9D2).

Infine per ottenere l'anticorpo umanizzato MNAC13 in forma di immunotossina è possibile esprimere al carbossi-terminale del dominio costante CH1 la proteina basica protamina amplificata per PCR utilizzando inneschi specifici dotati del sito di restrizione agli estremi per il clonaggio non direzionale *XbaI* (come riportato in Figura 9D3).

ESPRESSIONE E SAGGIO DI LEGAME DEGLI ANTICORPI UMANIZZATI MNAC13 e α D11

250 mila cellule COS sono state cotrasfettate con 1 μ g di DNA plasmidico codificante per VH a VK di ciascun anticorpo umanizzato (in totale 2 μ g) mediante FuGENE secondo protocollo consigliato (Roche).



Sono stati utilizzati i costrutti per ottenere gli anticorpi umanizzati in forma di IgG1.

In parallelo alle cotrasfezioni dei costrutti sopra descritti, sono stati cotrasfettati per ciascun anticorpo le corrispondenti forme chimeriche, ovvero:

la VH murina di MNAC13 clonata in CMV pVH express e la Vk murina di MNAC13 clonata in CMV pVk express;

per quanto riguarda α D11 la VH di ratto è clonata in fusione con la Cy di origine umana in pcDNA1 e la Vk di ratto è clonata in fusione con la Cy di origine umana in pcDNA1.

Dopo 72 ore dalla trasfezione è stato raccolto il surnatante, che contiene le immunoglobuline espresse dalle cellule ospiti, è stato concentrato mediante Centriprep 50 (Amicon).

La capacità di riconoscere i rispettivi ligandi dei due anticorpi umanizzati è stata verificata mediante saggio ELISA e comparata con le rispettive forme chimeriche. I risultati sono riportati in Figura 10 e 11.

Per l'immobilizzazione su plastica, piastre Maxi sorb da 96 pozzetti sono state incubate a 4°C over night con una soluzione contenente i rispettivi ligandi dei due anticorpi (l'immunoadesina ricombinante purificata TrkA Camel e l'NGF murino purificato da ghiandole submandibolari) a una concentrazione di 10 μ g/ml in tampone sodio carbonato 0.1M pH 9.6.

Dopo un'ora di blocking con PBS contenente latte al 3% (MPBS) a temperatura ambiente, sono stati incubati con diluizioni seriali dei surnatanti concentrati (1:2, 1:20; 1:200) e in parallelo anche con il surnatante di cellule COS non transfettate (controllo negativo).

Dopo incubazione con l'anticorpo primario (che riconosce la regione costante C γ di origine umana) e con il secondario (anti-rabbit coniugato con perossidasi), e' possibile rilevare l'attivita' di legame come densita' ottica a 450 nm (OD450) mediante incubazione con il substrato TMB (TECNA). Sono stati inclusi come controlli positivi i rispettivi anticorpi monoclonali a una concentrazione di 500 ng/ml.

La Figura 10B riporta i risultati di un analogo saggio ELISA condotto a seguito della purificazione mediante cromatografia di affinita' delle immunoglobuline espresse. In dettaglio i surnatanti delle cellule transfettate sono stati raccolti e, rimossi i detriti cellulari per centrifugazione, sono stati incubati con 100 μ l di Protein G Sepharose e a seguito di estensivi lavaggi con PBS ogni proteina e' stata eluita con 1 mM HCl e il pH e' stato neutralizzato subito dopo l'eluizione con 1 M Tris pH 8.8. Le rispettive concentrazioni sono state stimate con saggio Lowry.

Bibliografia

Adair *et al.* *Hum.Antibod.Hybridomas* 5:41(1994)

Angeles *et al.* *Anal Biochem*; 236, 49 (1996)

Baca *et al.* *J.Biol.Chem.* **272**:10678 (1997)

Baker *et al.* "Antigen and Antibody Molecular Engineering":61 (1994)

Barinaga, *Science*; 264, 272 (1994)

Benhar *et al.* *P.N.A.S.* **91**:12051 (1994)

Bentley *et al.* *Nature*; 348, 254 (1990)

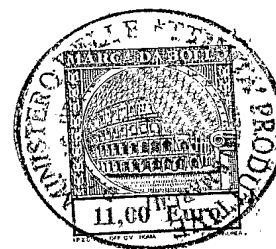
Benvenuto *et al.* *Plant Mol. Biol*; 17 865 (1991)

Berardi *et al.* *PNAS*; 91, 684 (1994)

Berman *et al.* *Nucleic Acids Res.*; 28, 235 (2000).

- Bird *et al. Science*; 242, 423 (1988)
- Bold *et al. J. Neurochem.*; 64, 2622 (1995)
- Buhler *et al. Bio/Technology*; 8, 140 (1990)
- Buchner and Rudolph, *Bio/Technology*; 9, 157 (1991)
- Brünger, *Acta Cryst.*; D54, 905 (1998)
- Carter *et al. P.N.A.S.* **89**:4285 (1992)
- Carugo and Pongor *Protein Science* **10**, 1470 (2001)
- Carugo, *J. Appl. Cryst.*; 36, 125 (2003)
- Cattaneo *et al. J. Neurosci.*; 19, 9687 (1999)
- Cesareni, *FEBS Lett*; 307, 66 (1992)
- Clackson *et al. Nature*; 352, 624 (1991)
- Chaudhary *et al., Nature*; 339, 394 (1989)
- Chen *et al., Gene Ther*; 2, 116 (1995)
- Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.*; 196, 901 (1987)
- Chothia *et al. Nature*; 342, 878 (1989).
- Co *et al. PNAS*; 88, 2869 (1991)
- Co *et al. J.Immunol.* **148**:1149-1154 (1992)
- Cook *et al. Prot.Engng.* **9**:623-628 (1996)
- Couto *et al. "Antigen and Antibody Molecular Engineering"* 55 (1994)
- Daugherty *et al. Nucleic Acid Res.* **19**:2471 (1991)
- DeMartino *et al. Antibod. Immunoconj. Radiopharmaceut.* **4**:829 (1991).
- Delsite *et al. J. Androl.*; 17, 481 (1996)
- De Schryver-Kecsckemeti *et al. Arch. Pathol.*; 111, 833 (1987)
- Diederichs, *Proteins* : 23 187 (1995)
- Djakiew *et al. Cancer Res.*; 51, 3304 (1991)
- Domenici *et al. Vis Neurosci.*; 11, 1093 (1994)

- Durin *et al. Plant Mol. Biol.*; 15, 281 (1990)
- Eigenbrot *et al. Proteins* **18**: 49 (1994)
- Ellis *et al. J.Immunol.* **155**:925 (1995)
- Foote & Winter *J.Mol.Biol.* **224**:487 (1992)
- Garrard *et al. Bio/Techniques*; 9, 1373 (1991)
- Gillman & Smith, *Gene*; 8, 81 (1979)
- Goretzki *et al. Surgery*; 102, 1035 (1987)
- Gorman *et al. PNAS*; 88, 4181 (1991)
- Graziano *et al. J.Immunol.* **155**:4996 (1995)
- Gram *et al. PNAS*; 89, 3576 (1992)
- Geldof *et al. J. Cancer Res. Clin. Oncol.*; 123, 107 (1997)
- George *et al. The Prostrate*; 36, 172 (1998)
- Goding, *Monoclonal antibodies: Principle and practise*, 2nd edition, Academic Press (1986)
- Gussow & Seemann *Meth.Enzymol.* **203**:99 (1991)
- Hakimi *et al. J.Immunol.* **151**:1075 (1993)
- Hamilton *et al. J.Infect.Diseases* **176**:59 (1997)
- Harlow and Lane, *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)
- Hiatt *et al. Nature*; 342, 76 (1989)
- Hood *et al. Immunology*, Benjamin, N. Y., 2nj ed. (1984)
- Hsiao *et al. Prot.Engng.* **7**:815 (1994)
- Hunkapiller and Hood, *Nature*; 323,15 (1986)
- Huston *et al. PNAS*; 85, 5879 (1988)
- Jancarik & Kim, *Appl. Cryst.*; 24, 409 (1991)
- Jones *et al. Nature*; 321, 522 (1986)



- Kashmiri *et al. Hybridoma* **14**:461 (1995)
- Kettleborough, *Protein Engineering*; 4, 773 (1991)
- Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda MD, 1987 e 1991)
- Kleywegt & Jones, *Structure*; 2, 1241 (1994).
- Kolbinger *et al. Prot.Engng.* **6**:971-980 (1993)
- Kodandapani *et al. Biochem. Biophys., Res. Comm.*; 251, 61 (1998)
- Koizumi *et al. Pathol. Int.*; 48, 93 (1998)
- Lachyankar *et al. Cancer Res*; 57, 532 (1997)
- Lanzavecchia *et al. Eur. J. Immunol.*; 17, 105 (1987)
- Larrick & Fry, *Hum. Antibodies Hybridomas*; 2, 172 (1991)
- Laskowski *et al. J. Appl. Cryst.*; 26, 283 (1993)
- Lefkovits e Pernis, Immunological Methods, Vols. I and II (Academic Press, NY, 1979 and 1981).
- Leger *et al. Hum.Antibod.* **8**:3-16 (1997)
- Lewin & Mendell, *Trends Neurosci*; 16, 353 (1993)
- Lewis & Crowe *Gene* **101**:297 (1991)
- Lindsay, *Ciba Foundation Symposium*; 196, 39, (1996)
- MacGrogan *et al., J. Neurochem.*; 59, 1381 (1992)
- Maeda *et al. Hum.Antibod.Hybridomas* **2**:124 (1991)
- Maffei *et al. J Neurosci*; 12, 4651 (1992)
- Marchetti *et al. Cancer Res.*; 56, 2856 (1996)
- Matsushima & Bogenmann, *Mol Cell Biol.*; 13, 7447 (1993)
- Meade *et al. Bio/Technology*; 8, 443 (1990)
- McGregor *et al. PNAS*; 96, 4540 (1999)
- Miknyoczki *et al. Int. J. Cancer*; 81, 417 (1999)

- Miknyoczki *et al. Crit. Rev. Oncogenesis*; 7, 89 (1996).
- Miralles *et al. J. Endocrinology*; 156, 431 (1998)
- Molnar *et al. Eur J Neurosci*; 10, 3127 (1998)
- Molnar *et al. Neuroreport*; 8, 575 (1997)
- Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy (eds. Baldwin and Byers, Academic Press, 1985), 159, 224
- Muragaki *et al. J Neurosci*; 17, 530 (1997)
- Nakagawara *et al. N Engl J Med.*; 328, 847 (1993)
- Navaza *Acta Cryst.*; A50, 157 (1994).
- Oelmann *et al. Cancer Res.*; 55, 2212 (1995)
- Ohta *et al. J. Pathol.*; 181, 405 (1997)
- Oikawa, *et al. Int. J. Pancreat.*; 18, 15, (1995)
- Olsnes and Phil, *Pharmac. Ther.*; 25, 355 (1982)
- Otwinowski & Minor, *Methods Enzymol.*; 276, 307 (1997)
- Paik *et al. J. Nucl. Med.*; 23, 37 (1982)
- Passaniti *et al. Int. J. Cancer*; 51, 318 (1992)
- Paul, *Fundamental Immunology*, 3rd ed. Raven Press, N.Y., (1993)
- Pflug *et al. Mol. Carcin.*; 12, 106 (1998)
- Pflug *et al. Endocrinology*; 136, 262 (1995)
- Pflug *et al. Cancer Res.*; 52, 5403 (1992)
- Poul *et al. Mol. Immunol.* **32**:101 (1995)
- Presta *et al. J. Immunol.* **151**:2623 (1993)
- Putlitz *et al. Bio/Technology*; 8, 651 (1990)
- Queen *et al. P.N.A.S.* **86**:10029 (1989)
- Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980)

- Revoltella & Butler, *J. Cell. Physiol.*; 104, 27 (1980)
- Riechmann *et al.*, *Nature*; 332, 323 (1988)
- Roberts *et al.*, *Nature*; 328, 731 (1987)
- Roguska *et al. Prot.Engng.* 9:895(1996)
- Roguska *et al. Prot.Engng.* 9:895 (1996)
- Roguska *et al. PNAS*, 91:969 (1994)
- Rosok *et al. J.Biol.Chem.* 271:22611 (1996)
- Routledge *et al. Eur.J.Immunol.* 21:2717 (1991)
- Ruberti *et al. J Neurosci.*; 20, 2589 (2000)
- Ruggeri *et al. Current Medicinal Chemistry*; 6, 845 (1999)
- Sato *et al. Canc.Res.* 53:851 (1993)
- Sato *et al. Mol.Immunol.* 31:371 (1994)
- Sato *et al. Hum.Antibod.Hybridomas* 7:175 (1996)
- Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., 1982).
- Scott & Smith, *Science*; 249, 386 (1990)
- Sha and Xiang *Canc.Biother.* 9:341 (1994)
- Shearman *et al. J. Immunol.*; 147, 4366 (1991)
- Skerra *et al. Bio/Technology*; 9, 273 (1991)
- Sijmons *et al. Bio/Technology*; 8, 217 (1990)
- Sims *et al. J.Immunol.* 151:2296 (1993)
- Singer *et al. J.Immunol.* 150:2844 (1993)
- Swimmer *et al. PNAS*; 89, 3756 (1992)
- Tagliabue *et al. J. Biol. Chem.*; 275, 5388 (2000)
- Tempest *et al. Prot.Engng.* 7:1501 (1994)
- Tempest *et al. Int.J.Biol.Macromol.* 17:37 (1995)
- Tempest *et al. Biotechnology*; 9, 266 (1991)

Thorpe *et al.* Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, 168 (1982)

U.S. Ser. No. 07/290,968

Verhoeyen *et al.* *Science* **239**:1534 (1988)

Verhoeyen *et al.* "*Monoclonal Antibodies*":37 (1991)

Verhoeyen *et al.* *Immunol.* **78**:364 (1993)

Winnacker, From Genes to Clones (VCH Publishers, NY, 1987)

Winter and Milstein, *Nature*; 349, 293 (1991)

Woolf *et al.*, *Neuroscience*; 62, 327 (1994).

WO91/08216, 1991

Zhu *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 17, 2419 (1999)

Zhu and Carter *J.Immunol.* **155**:1903 (1995)

de la casa



RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la umanizzazione delle regioni variabili VH e VL di un anticorpo animale di sequenza nota, comprendente le fasi di:
 - a) se non disponibile, ottenere la struttura cristallografica delle regioni variabili VH e VL dell'anticorpo animale;
 - b) pre-selezionare una serie da 0 a n di possibili frameworks accettori di anticorpi di origine umana o umanizzati, la cui struttura sia stata determinata sperimentalmente con una risoluzione non inferiore a 3 Å, sulla base del più elevato livello di omologia e di identità con la sequenza primaria del framework dell'anticorpo animale;
 - c) effettuare un confronto strutturale tra le regioni variabili VH e VL dell'anticorpo animale e le regioni VH e VL ottenute in b), rispettivamente, e calcolare per ciascun confronto la RMS, per identificare la regione VH e la regione VL di origine umana con la RMS minore;
 - d) inserire in posizione opportuna le sequenze delle regioni CDR dell'anticorpo animale nelle sequenze umane identificate in c);
 - e) eventualmente retromutare uno o più residui amminoacidici delle regioni VH e VL umane identificate in c).
2. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui le modifiche dell'anticorpo avvengono con tecniche del DNA ricombinante.
3. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui l'anticorpo animale è un anticorpo anti-NGF.
4. Metodo secondo la rivendicazione 2 in cui l'anticorpo animale anti-NGF è l'anticorpo alfa D11, e le sequenze umanizzate hanno essenzialmente le seguenti sequenze VH: Hum alfa D11 VH,

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLE
WVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAYLQMNSLRAEDTAV
YYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSS,

e VL: Hum alfa D11Vk,

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLI
YNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPR
TFGQGTKVEIK.

5. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui l'anticorpo animale è un anticorpo anti-TrkA.

6. Metodo secondo la rivendicazione 4 in cui l'anticorpo animale anti-TrkA è l'anticorpo MNAC13, e le sequenze umanizzate hanno essenzialmente le seguenti sequenze: VH: HumMNAC13VH,

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYTMSWARQAPGKGLE
WVAYISKGGGSTYYPDTVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDSAV
YYCARGAMFGN DFFFPMDRWGQGTLVTVSSA,

e VL: Hum MNAC13Vk,

DIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPKLLIY
TTSN LASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCHQWSSYPW
TFGGG GTKVEIK.

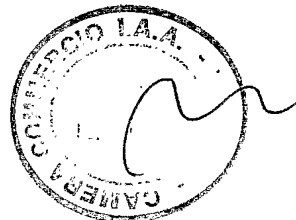
7. Anticorpo animale umanizzato ottenibile secondo il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti.

8. Anticorpo animale anti-NGF umanizzato ottenibile secondo il metodo delle rivendicazioni 3 o 4.

9. Anticorpo animale anti-TrkA umanizzato ottenibile secondo il metodo delle rivendicazioni 5 o 6.

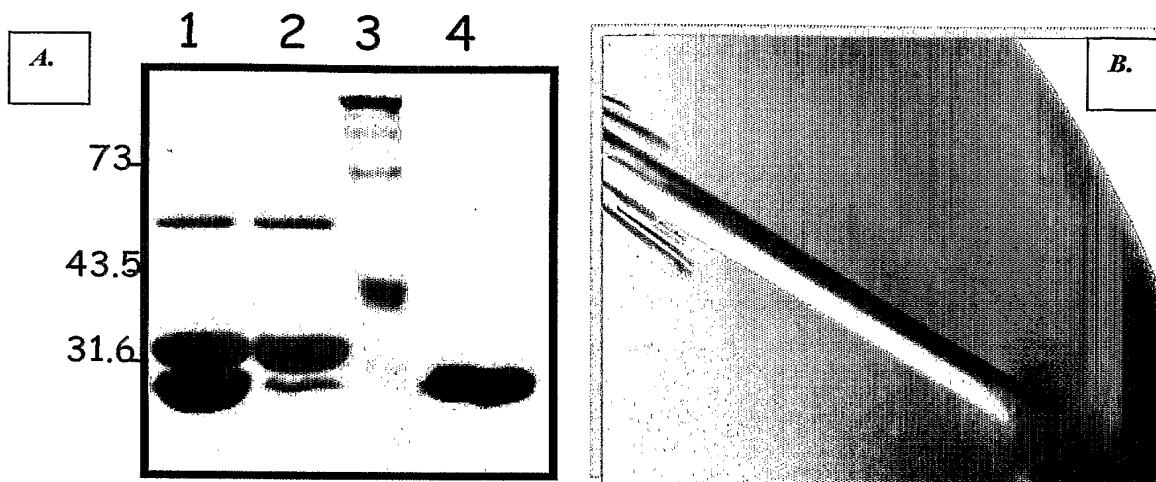
p.p. LayLine Genomics Spa e S.I.S.S.A.

olga capasso
UN MANDATARIO
per lei e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

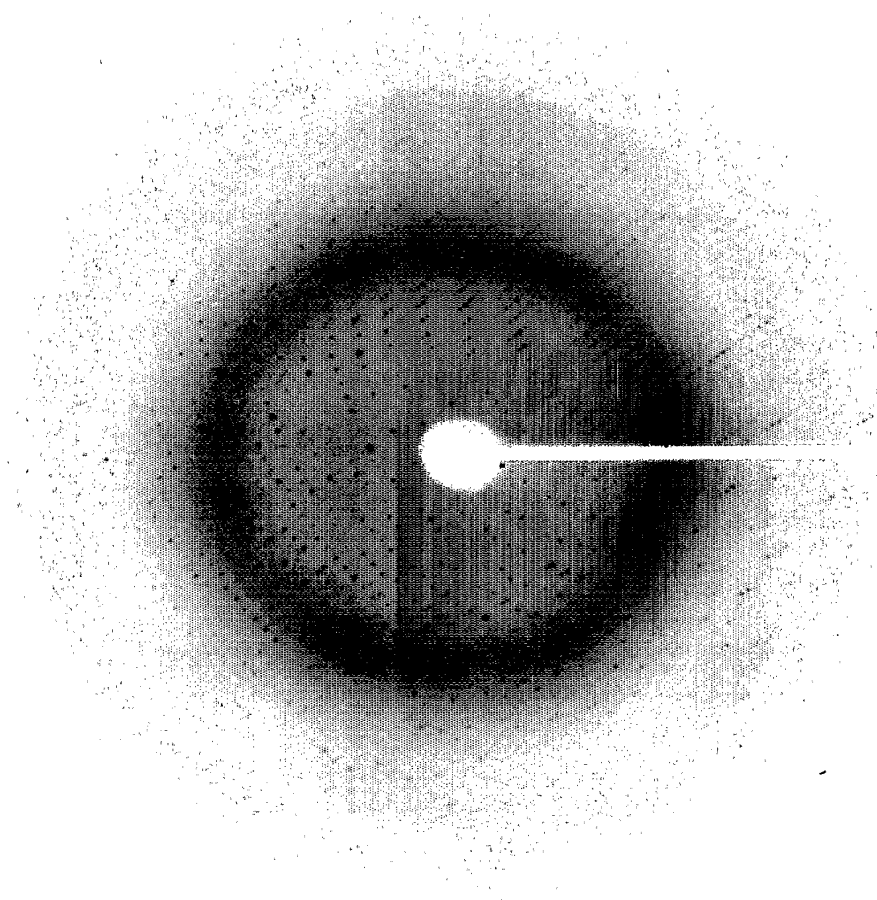


RM 2003 A 000601

FIGURA 1 (1 di 2)



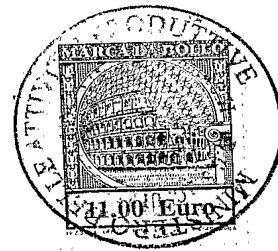
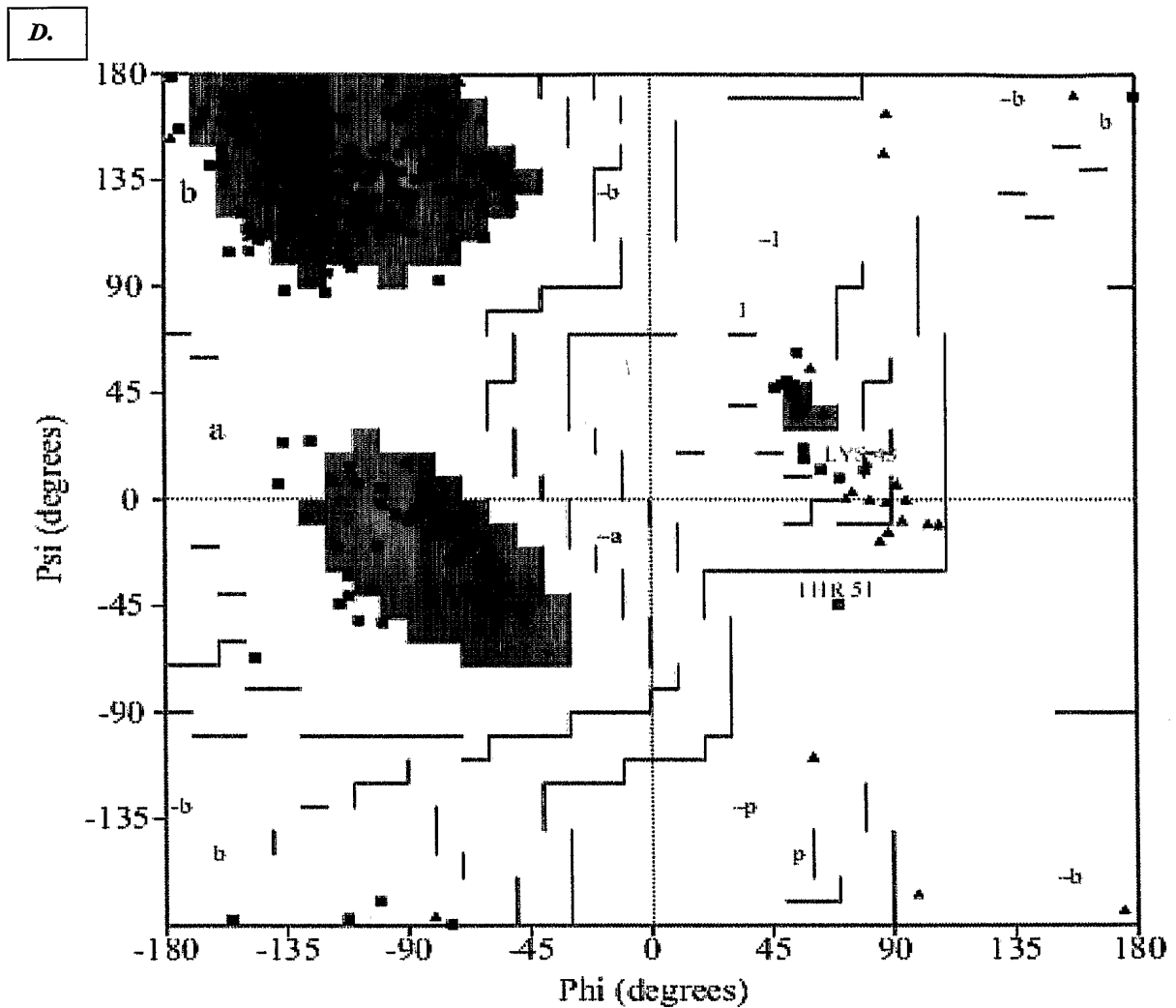
C.



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
AVV. d. Sc. 820 B

RM 2003 A 000001

FIGURA 1 (2 di 2)



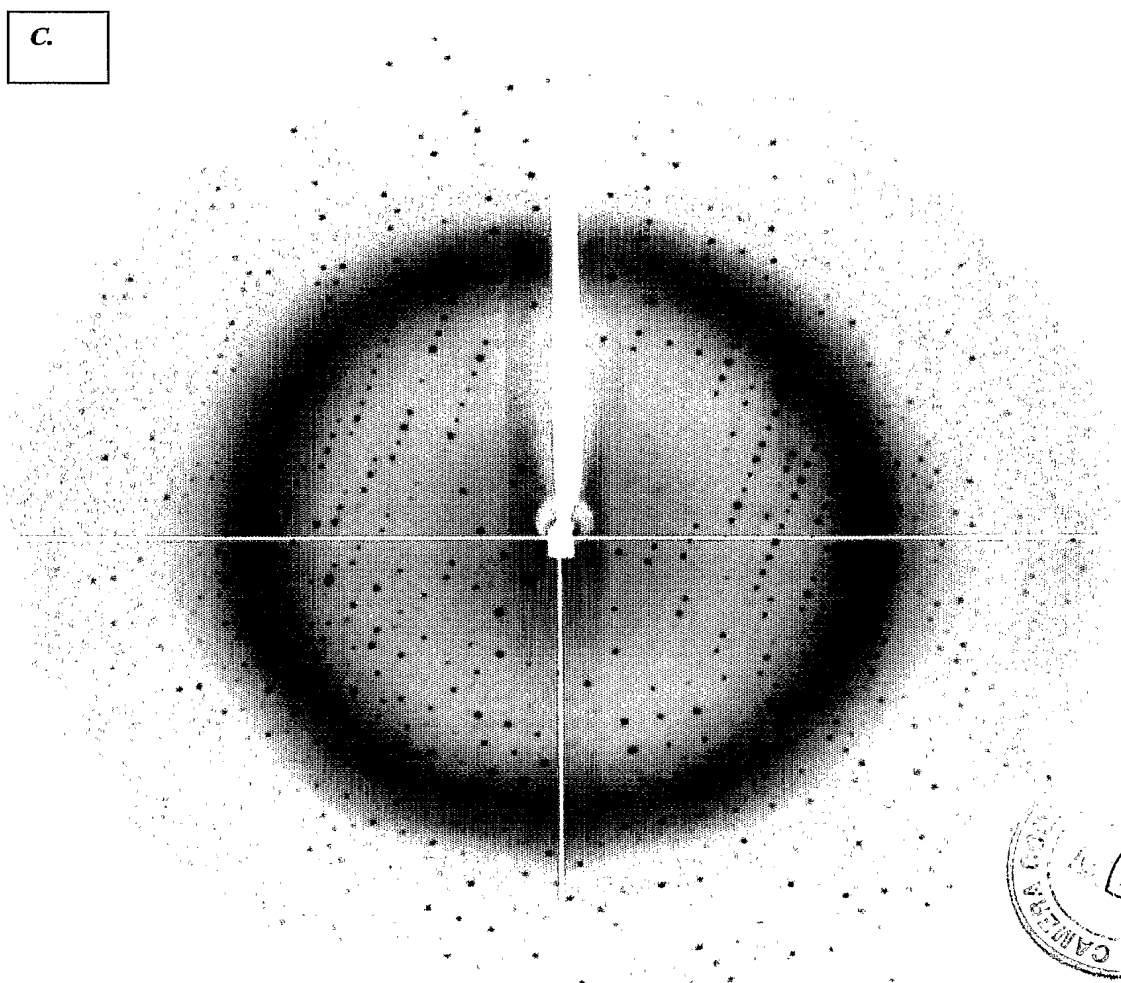
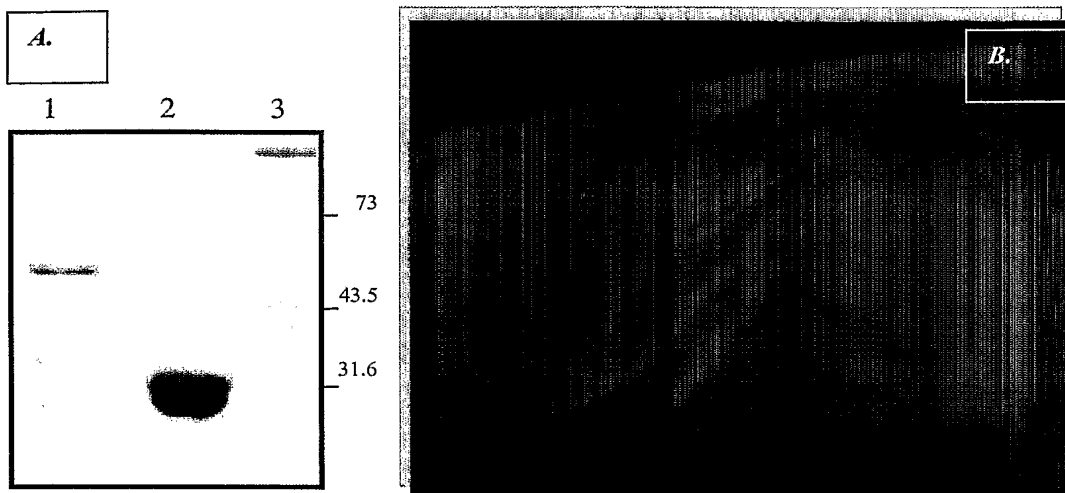
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'isr. 820 B)

olga capasso

3/23

RM 2003 A 000601

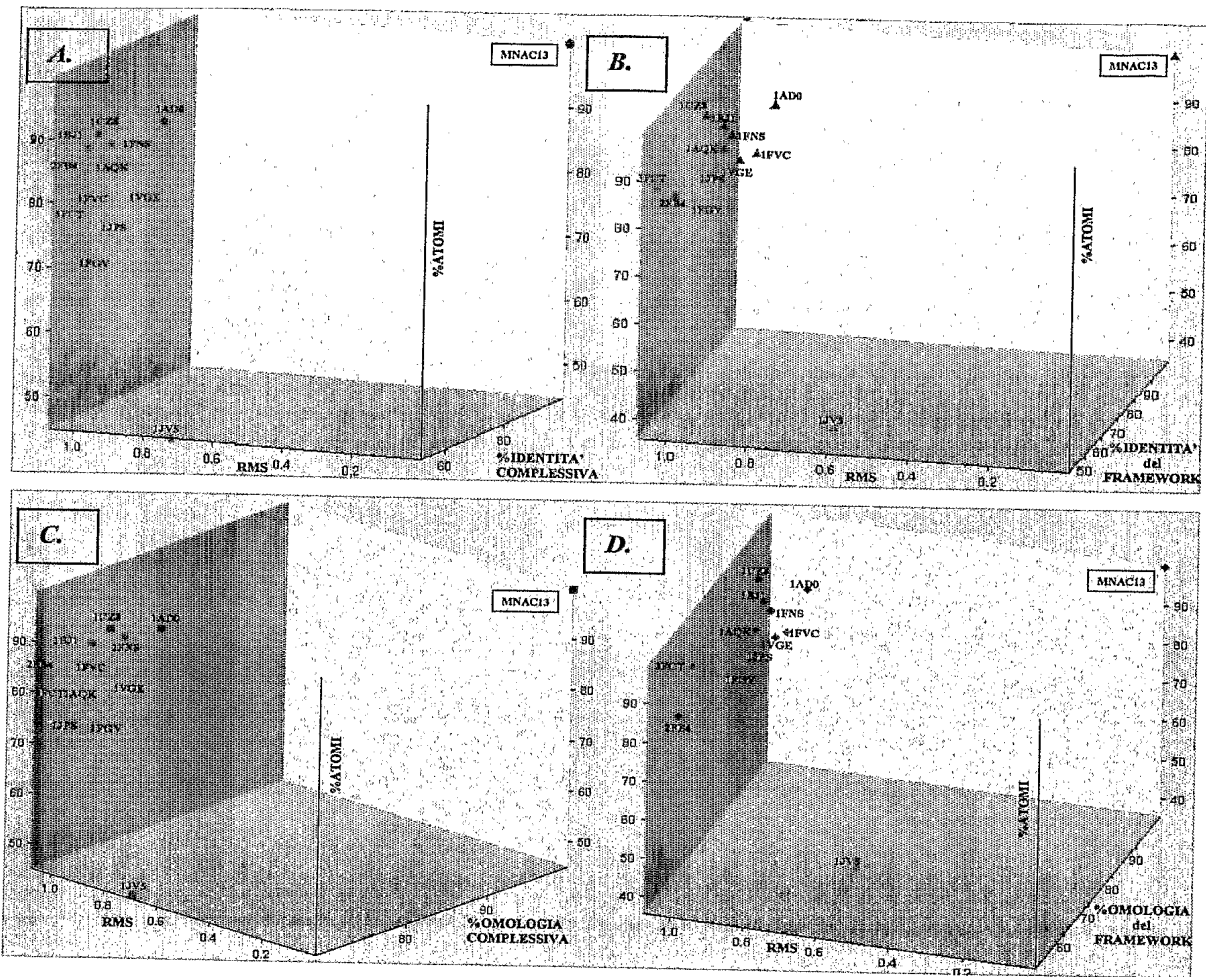
FIGURA 2 (1 di 2)



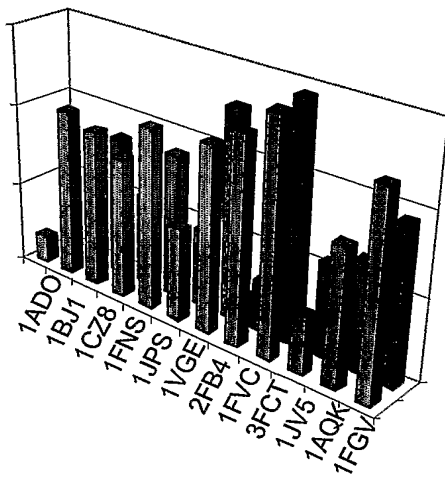
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Carasso
19/01/2003

(N° d'inscr. 820 B)
 olga esposo

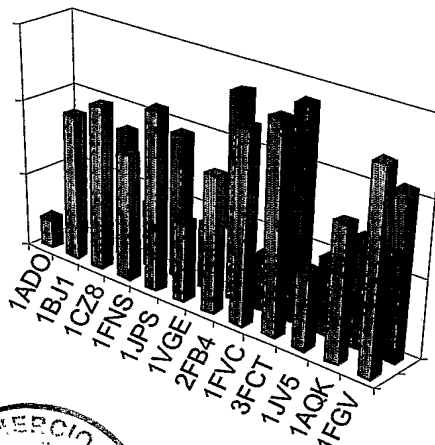
FIGURA 3 (1 di 2)



E. identita' con MNAC13



F. omologia con MNAC13

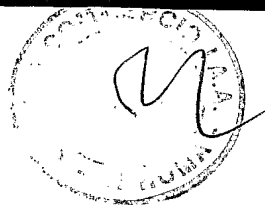
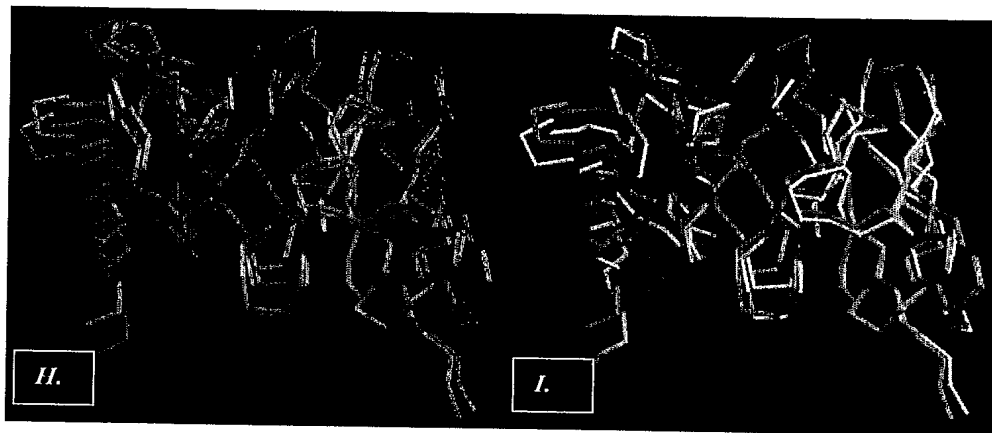
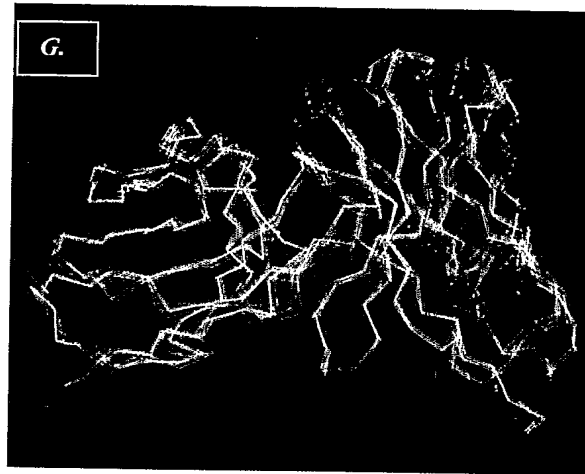


UN MANDATARIO
per se e per gli altri:

Olga Capasso
(ser. 220 D)

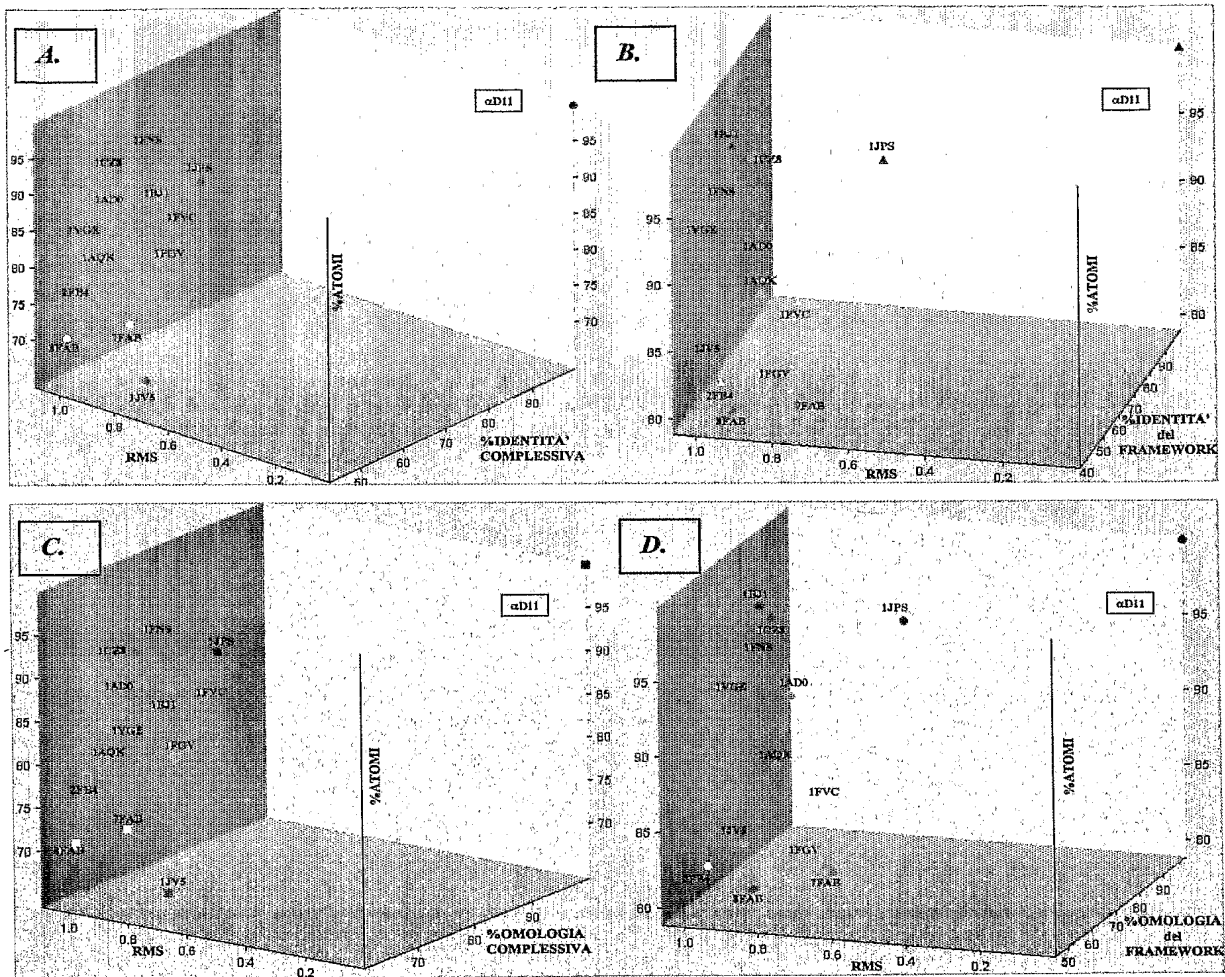
RM 2003 A^{6/23} 000601

FIGURA 3 (2 di 2)



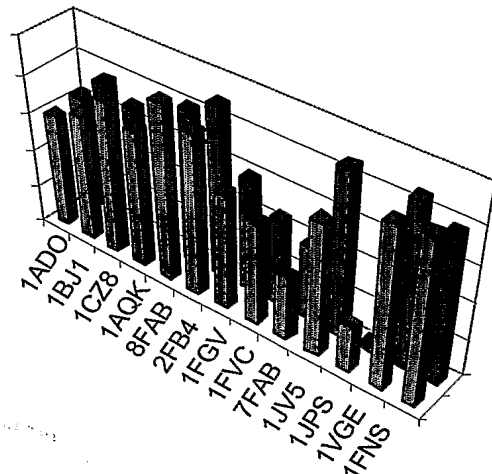
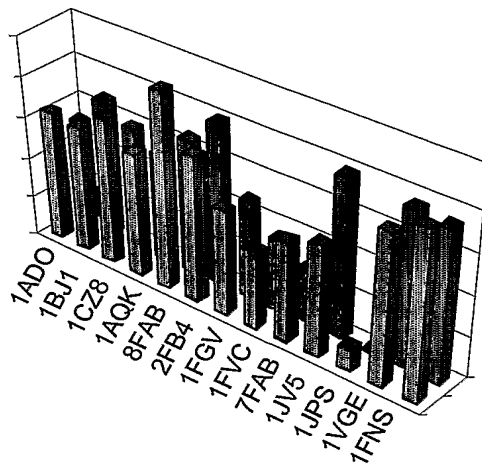
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
del 12/12/2003

FIGURA 4 (1 di 2)



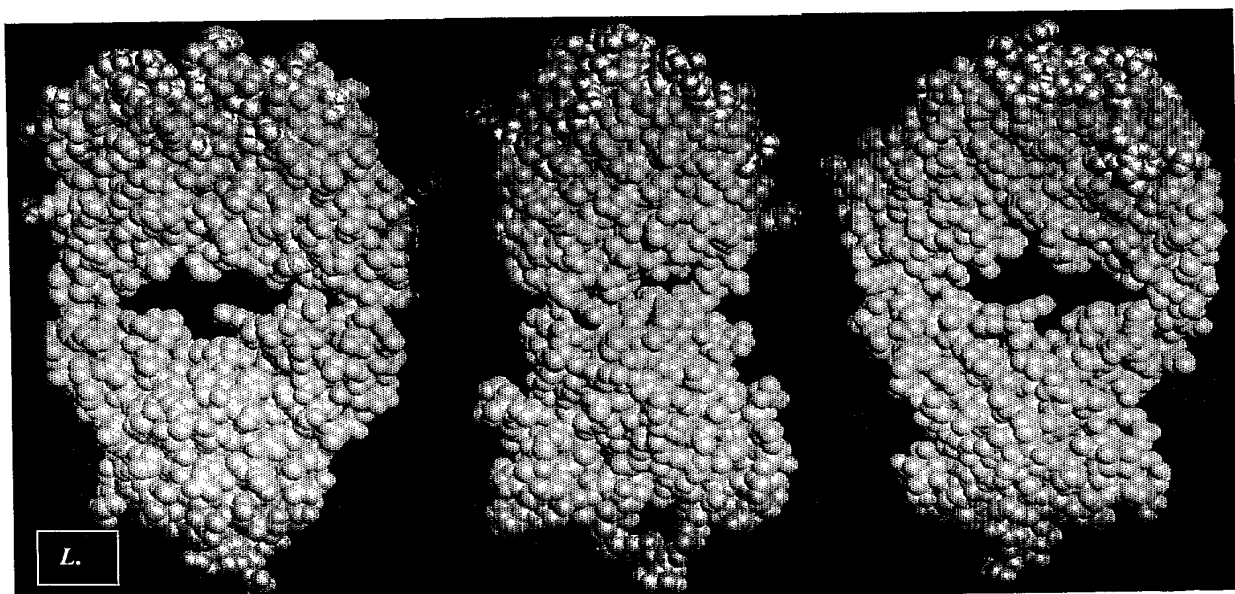
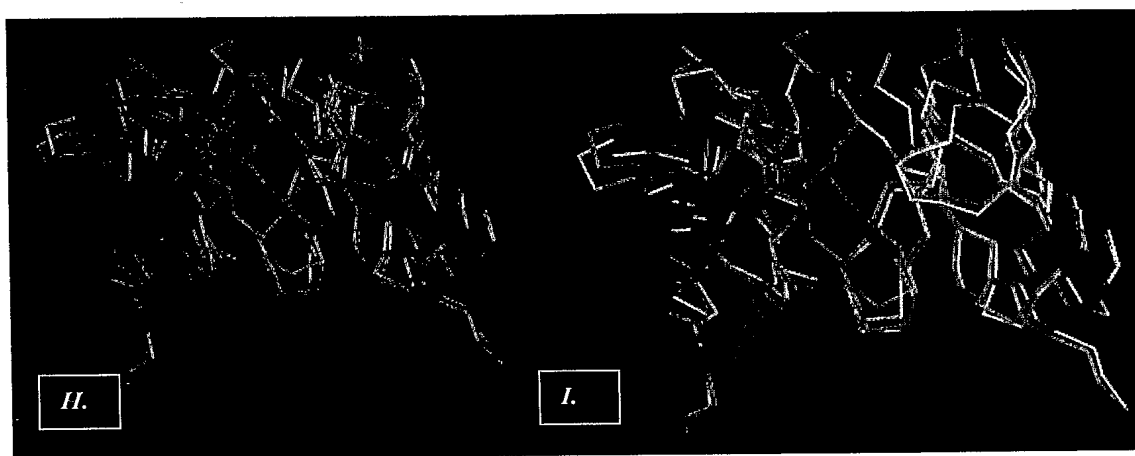
A. identita' con $\alpha D11$

B. omologia con $\alpha D11$



RM 2003 A^{8/23} 000601

FIGURA 4 (2 di 2)



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso

19/10/2003

9/23

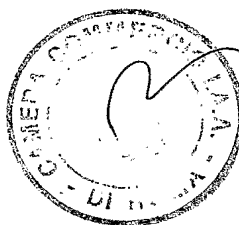
FIGURA 5

A. FRAMMENTO Fv DELLA CATENA PESANTE

	20	40
MNAC13	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTFSTYTMSWARQTPEKRLEWVAYISKG--	
1AD0	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTTFDYIMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKAN	
Hum MNAC13	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYTMSWARQAPGKGLEWVAYISKG--	
	60	80
MNAC13	GGSTYYPD TVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSLKS EDTALYYCARGAMFGNDFFFPMD	
1AD0	GYTTEYSASVKGRFTISRDKSKSTLYLQMN TLQAEDSAIYYCTDR---GLRFYFD	
Hum MNAC13	GGSTYYPD TVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDSAVYYCARGAMFGNDFFFPMD	
	60	80
MNAC13	RWGQGT SVTVSSA	
1AD0	YWGQGT LVTVSSA	
Hum MNAC13	RWGQGT LVTVSSA	

B. FRAMMENTO Fv DELLA CATENA LEGGERA

	20	40
MNAC13	DIVLTQSPAIMSASLGEEVTLTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKLLIYTTSNL	
1AD0	QTVLTQSPSSLSVSVGDRVTITCRASSSVTYIH WYQQKPG LAPKSLIYATSNL	
Hum MNAC13	DIVLTQSPSSLSASV GDRVTITC <u>SASSSVSYMHWYQQKPGQAPKLLIYTTSNL</u>	
	60	80
MNAC13	ASGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSSYPWTFGGG TKLEIK	
1AD0	ASGVPSRFSGSGSGTDYTF TISSLPEDIATYYCQHWSSKPPTFGQGT KVEVK	
Hum MNAC13	<u>ASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDVATYYCHQWSSYPWTFGGG TKVEIK</u>	



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 R)
Olga Capasso

10/23

FIGURA 6

A. FRAMMENTO Fv DELLA CATENA PESANTE

	20	40
αD11	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTNNNVNWWVRQATGRGLEWMGGVWAG-G	
1JPS	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKEYMHVVRQAPGKGLEWVGLIDPEQG	
Hum αD11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWWVRQAPGKGLEWVGGVWAG-G	

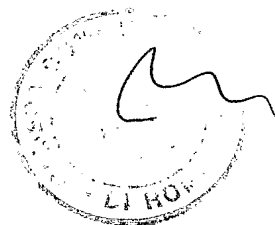
	60	80	100
αD11	ATDYN SALKSRLTITRDTSKSQVFLKMHSLQSEDTATYYCARDGGYSSSTLYAMD		
1JPS	NTIYDPKFQDRATISADNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTAA-----YFD		
Hum αD11	<u>ATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMD</u>		

αD11	AWGQGT TVTVSA
1JPS	YWGQGT LVTVSS
Hum αD11	<u>AWGQGT LVTVSS</u>

B. FRAMMENTO Fv DELLA CATENA LEGGERA

	20	40
αD11	DIQMTQSPASLSASLG ETVTIECRASEDIYNALAWYQQKPGKSPQLLIYNTDTL	
1JPS	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASRD IKS YLNWYQQKPGKAPKVLIIYATSL	
Hum αD11	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTL	

	60	80	100
αD11	HTGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLO SEDVAS YFCQHYFHYPRTFGGG TKLELK		
1JPS	AEGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQHGESPWTFGQGTKVEIK		
Hum αD11	<u>HTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIK</u>		



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
N° d'ufficio 828B

11/23

RM 2003 A 000601

FIGURA 7 (1 di 4)

A) MNAC13 VL

GAC ATT GTT CTC CTG TCC CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CTA GGG GAG GAG ATC ACC CTA ACC TGC AGT GCC AGC
TTG AGT GTA AGT TAC TAC CAC ATG CAG AAG TCA GGC ACT TCT CCC AAG CTC TTG ATT TAT ACT ACA TCC AAC
CTG GCT TCT TCT CGC TTC AGT GGC AGT GGC TCT GGG ACC TTT TAT TCT CTC ACA ATC AGT AGT GTG GAG
GCT GAA GAT GCT GCC GAT TAT TAC TGC CAT CAG TGG AGT AGT TAT CCA TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA
ATC AAA

B) MNAC13 VH

GAG GTG AAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGT TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA
TTC ACT TTC AGT ACC TAT ACC TAT ACC ATG TCT TGG GGT TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA TAC ATT AGT
AAA GGT GGT GGT ACC TAT ACC TAT CCA GAC ACT GTA AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGG GAC AAT GCG AAG AAC ACC
CTG TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCA AGA GGG GCT ATG TAT GGT AAC
GAT TTT TTC TAT CCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
No. d'iscr. 20 B)

12/23

RM 2003 A 000001

FIGURA 7 (2 di 4)

C) MNAC13 GRAFTED VL

5' D I V L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S
3' ACA GGC GTG CAC TCC GAC ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA TCC AGC CTG TCT GCG TCT GTG GGC GAC CGG GTG ACC ATT
CAG CCC CTG GCC CAG TGG TAA TGG ACG TCG 5'
3' A S S S V S Y M H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y T T S N L
5' OLIGO L1S
TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC AAG GCT CCC AAG CTC CTG ATT TAT ACT ACA TCC AAC CTG
CGG TCG AGA TCA CAC TCA ATG TAC GTG ACC ATG GTG CTC TTC GGT CCG
OLIGO L2AS 5'
3' A S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P E D F
5' GCT TCT GGA GTC CCT TCT ACC CTC ACA ATC AGT AGT CTG CAG CCT GAA GAT TTC
CGA AGA CCT CAG GGA AGA GCG AAG TCG CCG TCA CCC AGA CCC TGG CTA ATA TGG GAG TGT TAG TCA TCA GAC
OLIGO L4AS 5'
3' A T Y Y C H Q W S S Y P W T F G G G T K V E I K
5' OLIGO L5S
GCC ACC TAT TAC TGC CAT CAG TGG AGT AGT TAT CCA TGG ACG
ACC TCA TCA ATA GGT ACC TGC AAG CCA CCT CCG TGG TTC CAC CTT TAT TTT GCA CTC ATC TTA TCT
OLIGO L6AS 5'
3'

AGA TTG AAT
3' 5'



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
d'isr. (20 B)

13/23

RM 2003 A 000001

FIGURA 7 (3 di 4)

D) MNAC13 GRAFTED VH

5' E V Q L L E S G G L V Q P G G S L R L S C A A 3'
 ACA GGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG CTG GAG TCT GGG GGA GGT TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CTG CGC CTC TCC TGT
 CCC AGG GAC GCG GAG AGG ACA CGT CGG 5'
 3' S G F T F S T Y T M S W A R Q A P G K G L E W V A Y I S K 3'
 OLIGO H1S
 TGG GCT CGC CAG GCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC GCA TAC ATT AGT AAA
 AGA CCT AAG TGA AAG TCA TGG ATA TGG TAC TCG ACC CGA GCG GTC CGG GGT CCC 5'
 OLIGO H2AS
 3' G G G S T Y Y P D T V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q 3'
 OLIGO H3S
 GGT GGT AGT ACC TAC TAT CCA GAC AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA
 CCA TCA TGG ATG ATA GGT CTG TGA CAT TTC CCG GCT AAG TGG TAG AGG TCC CTG TTG AGC TTC TTG TGG GAC ATG GAC GTT 5'
 OLIGO H4AS
 3' M N S L R A E D S A V Y Y C A R G A M F G N D F F P M D 3'
 OLIGO H5S
 ATG AAC AGT CTG CGG GCT GAG GAC AGC GCC GTC TAT TAC TGT GCA AGA GGG GCT ATG TTT
 ACA CGT TCT CCC CGA TAC AAA CCA TTG CTA AAA AAG AAA GGA TAC CTG 5'
 OLIGO H6AS
 3' R W G Q G T L V T V S
 GCG ACC CCA GTT CCT TGG GAC CAG TGG CAG AGG 5'

UN MANDATARIO
 per se e per gli altri
 N° d'iscri. 820 B)



14/23

RM 2003 A 000601



FIGURA 7 (4 di 4)

E) OLIGONUCLEOTIDI PER SINTETIZZARE MNAC13 VLOLIGO L1S

ACA GGC GTG CAC TCC GAC ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA TCC AGC CTG TCT GCG TCT GTC GGG GAC CGG GTC ACC ATT

OLIGO L24S

GCC TGG CTT CTG CTG GTA CCA GTG CAT GTA ACT CAC ACT AGA GCT GGC GCT GCA GGT AAT GGT GAC CCG GTC CCC GAC

OLIGO L3S

TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC AAG GCT CCC AAG CTC CTG ATT TAT ACT ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT TCT

OLIGO L44S

CAG ACT ACT GAT TGT GAG GGT ATA ATC GGT CCC AGA CCC ACT GCC GCT GAA GCG AGA AGG GAC TCC AGA AGC CAG

OLIGO L5S

ACC CTC ACA ATC AGT AGT CTG CAG CCT GAA GAT TTC GCC ACC TAT TAC TGC CAT CAG TGG AGT AGT TAT CCA TGG ACG

OLIGO L64S

TAA GTT AGA TCT ATT CTA CTC ACG TTT TAT TTC CAC CTT GGT GCC TCC ACC GAA CGT CCA TGG ATA ACT ACT CCA

F) OLIGONUCLEOTIDI PER SINTETIZZARE MNAC13 VHOLIGO H1S

ACA GGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GAG TCT GGG GGA GGT TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CTG CGC CTC TCC TGT

OLIGO H24S

CCC TGG GGC CTG GCG AGC CCA GCT CAT GGT ATA GGT ACT GAA AGT GAA TCC AGA GGC TGC ACA GGA GAG GCG CAG GGA CCC

OLIGO H3S

TGG GCT CGC CAG GCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC GCA TAC ATT AGT AAA GGT GGT AGT ACC TAC TAT CCA GAC

OLIGO H44S

TTG CAG GTA CAG GGT GTT CTT CGA GTT GTC CCT GGA GAT GGT GAA TCG GCC CTT TAC AGT GTC TGG ATA GTA GGT ACT ACC

OLIGO H5S

AAG AAC ACC CTG TAC CTG CAA ATG AAC AGT CTG CGG GCT GAG GAC AGC GCC GTC TAT TAC TGT GCA AGA GGG GCT ATG TTT

OLIGO H64S

GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC TTG ACC CCA GCG GTC CAT AGG AAA GAA AAA ATC GTT ACC AAA CAT AGC CCC TCT TGC ACA

UN MANDATARIO
per se e per gli altri

Olga Capasso

2003/02/20

15/23

RM 2003 A 000001

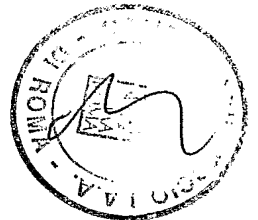
FIGURA 8 (1 di 4)

A) cd11 VL

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA GCT TCC CTG TCT GCA TCT CTG GGA GAA ACT GTC ACC ATC GAA TGT CGA GCA AGT GAG GAC ATT
TAT AAT GCT TTA GCA TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGG AAA TCT CCT CAG CTC CTG ATC TAT AAT ACA GAT ACC TTG CAT ACT GGG GTC
CCA TCA CGA TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGT ACA CAA TAT TCT CTC AAG ATA AAC AGC CTG CAA TCT GAA GAT GTC GCA AGT TAT TTC
TGT CAG CAC TAT TTC CAT TAT CCT CGG ACG TTC GGT GGA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

B) cd11 VH

CAG GTG CAG CTG GTG GAA TCA GGA CCT GGT CTG GTG CAG CCC TCA CAG ACC CTG TCC CTC ACC CTC TAT GCT ATG GAT GCC CAA GGA
ACC AAC AAC AAT GTG AAC TGG GTT CGA CAG GGT CTG GAG TGG AGT GGA GGA GTC TGG GCT GGT GGA GCC ACA GAT
TAC AAT TCA GCT CTC AAA TCC CGA CTG CTG ACC ATC ACT AGG GAC ACC TCC AAG AGC CAA GTT TTC TTA AAA ATG CAC ATG CTG CAA
TCT GAA GAC ACA GCC ACT TAC TAC TGT GCC AGA GAC GGG GGC TAT AGC AGC TCT ACC CTC TAT GCT ATG GAT GCC TGG GGT CAA GGA
ACT TCG GTC ACC GTC TCC TCA



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'isr. 820 B)
olga capasso

RM 16/23

FIGURA 8 (2 di 4)

C) cd11 GRAFTED VL

5' D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R 3'

ACA GGC GTG CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG TCT GCA TCT GTG GGA GAC CGC GTC ACC ATC

CAC CCT CTG GCG CAG TGG TAG TGT ACA GCT 5'

3' A S E D I Y N A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y N T D T 3'

OLIGO L1S

GCA TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAT ACA GAT ACC TGG

CGT TCA CTC CTG TAA ATA TTA CGA AAT CGT ACC ATA GTC GTC TTC GGT 5'

OLIGO L2AS

3' L H T G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P E D 3'

TTG CAT ACA GGG GTC CCA

AAC GTA TGT CCC CAG GGT AGT GCT AAG TCA CCG TCA CCT AGA CCA TGT CTG ATA TGA GAG TGC TAT TCG TCG GAC

OLIGO L4AS

5' F A T Y F C Q H Y F H Y P R T F G Q G T K V E I K 3'

OLIGO L5S

TTC GCA ACT TAT TTC TGT CAG CAC TAT TTC CAT TAT CCT CGG

GTG ATA AAG GTA ATA GGA GCC TGC AAG CCA GTT CCC TGG TTC CAC CTC TAG TTT GCA CTC ATC TTA 5'

OLIGO L6AS

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
N° 1588

5' MAGA TCT AAC 3'

3' 5'

FIGURA 8 (3 di 4)

D) cd11 GRAFTED VH

5' E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A 3'
ACA GGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG CAG GTG GAA TCA GGA GGT GGT CTG GTG CAG CCC GGA GGG TCC CTG CGC CTC AGC TGC
CCC AGG GAC GCG GAG TCG ACG CGA CGG 5'

5' S G F S L T N N N V N W V R Q A P G K G L E W V G G V W A 3'
AAC TGG GTT CGA CAG GCT CCA GGA AAA GGT CTG GAG TGG GTG GGA GTC TGG GCT
AGA CCG AAG AGT GAT TGG TTG TTA CAC TTG ACC CAA GCT GTC CGA GGT CCT
OLIGO H2AS 5'

5' G G A T D Y N S A L K S R R F T I S R D N S K N T A Y L Q M 3'
GGT GGA GCC ACA GAT TAC AAT TCA
CCT CGG TGT CTA ATG TTA AGT CGA GAG TTT AGG GCT AAG TGG TAG TCA GCG CTG TTG AGG TTC TTG TGT CGA ATG AAT GTT TAC
OLIGO H4AS 5'

5' N S L R A E D T A V Y Y C A R D G G Y S S S T L Y A M D A 3'
AAC AGT CTG CGC GCT GAA GAC ACA GCC GTT TAC TAC TGT GCC AGA GAC GGG GGC TAT AGC
CGG TCT CTG CCC CCG ATA TCG TCG AGA TGG GAG ATA CGA TAC CTA CGG
OLIGO H6AS 5'

W G Q G T L V T V S S
ACC CCA GTT CCT TGA GAC CAG TGG CAG AGG AGT 5'

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'is. r. 820 B)

FIGURA 8 (4 di 4)

E) OLIGONUCLEOTIDI PER SINTETIZZARE cd11 VL

OLIGO L1S

ACA GGC GTG CAC TCC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG TCT GCA TCT GTG GGA GAC CGC GTC ACC ATC

OLIGO L2AS

TGG CTT CTG CTG ATA CCA TGC TAA AGC ATT ATA AAT GTC CTC ACT TGC TCG ACA TGT GAT GGT GAC GCG GTC TCC CAC

OLIGO L3S

GCA TGG TAT CAG CAG AAG CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAT ACA GAT ACC TTG CAT ACA GGG GTC CCA

OLIGO L4AS

CAG GCT GCT TAT CGT GAG AGT ATA GTC TGT ACC AGA TCC ACT GCC ACT GAA TCG TGA TGG GAC CCC TGT ATG CAA GGT

OLIGO L5S

ACT CTC ACG ATA AGC AGC CTG CAA CCT GAA GAT TTC GCA ACT TAT TTC TGT CAG CAC TAT TTC CAT TAT CCT CGG

OLIGO L6AS

CAA TCT AGA ATT CTA CTC ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC TTG ACC GAA CGT CCG AGG ATA ATG GAA ATA GTG

F) OLIGONUCLEOTIDI PER SINTETIZZARE cd11 VH

OLIGO H1S

ACA GGC GCG CAC TCC GAG GTG CAG CTG GTG GAA TCA GGA GGT GGT CTG GTG CAG CCC GGA GGG TCC CTG CGC CTC AGC TGC

OLIGO H2AS

TCC TGG AGC CTG TCG AAC CCA GTT CAC ATT GTT GGT TAG TGA GAA GCC AGA GGC AGC GCA GCT GAG GCG CAG GGA CCC

OLIGO H3S

AAC TGG GTT CGA CAG GCT CCA GGA AAA GGT CTG GAG TGG GTG GGA GTC TGG GCT GGT GGA GCC ACA GAT TAC AAT TCA

OLIGO H4AS

CAT TTG TAA GTA AGC TGT GTT CTT GGA GTT GTC GCG ACT GAT GGT GAA TCG GGA TTT GAG AGC TGA ATT GTA ATC TGT GGC TCC

OLIGO H5S

AAG AAC ACA GCT TAC TTA CAA ATG AAC AGT AGT CTG CGC GCT GAA GAC ACA GCC GTT TAC TGT GCC AGA GAC GGG GGC TAT AGC

OLIGO H6AS

TGA GGA GAC GGT GAC CAG AGT TCC TTG ACC CCA GGC ATC CAT AGC ATA GAG GGT AGA GCT GCT ATA GCC CCC GTC TCT GGC

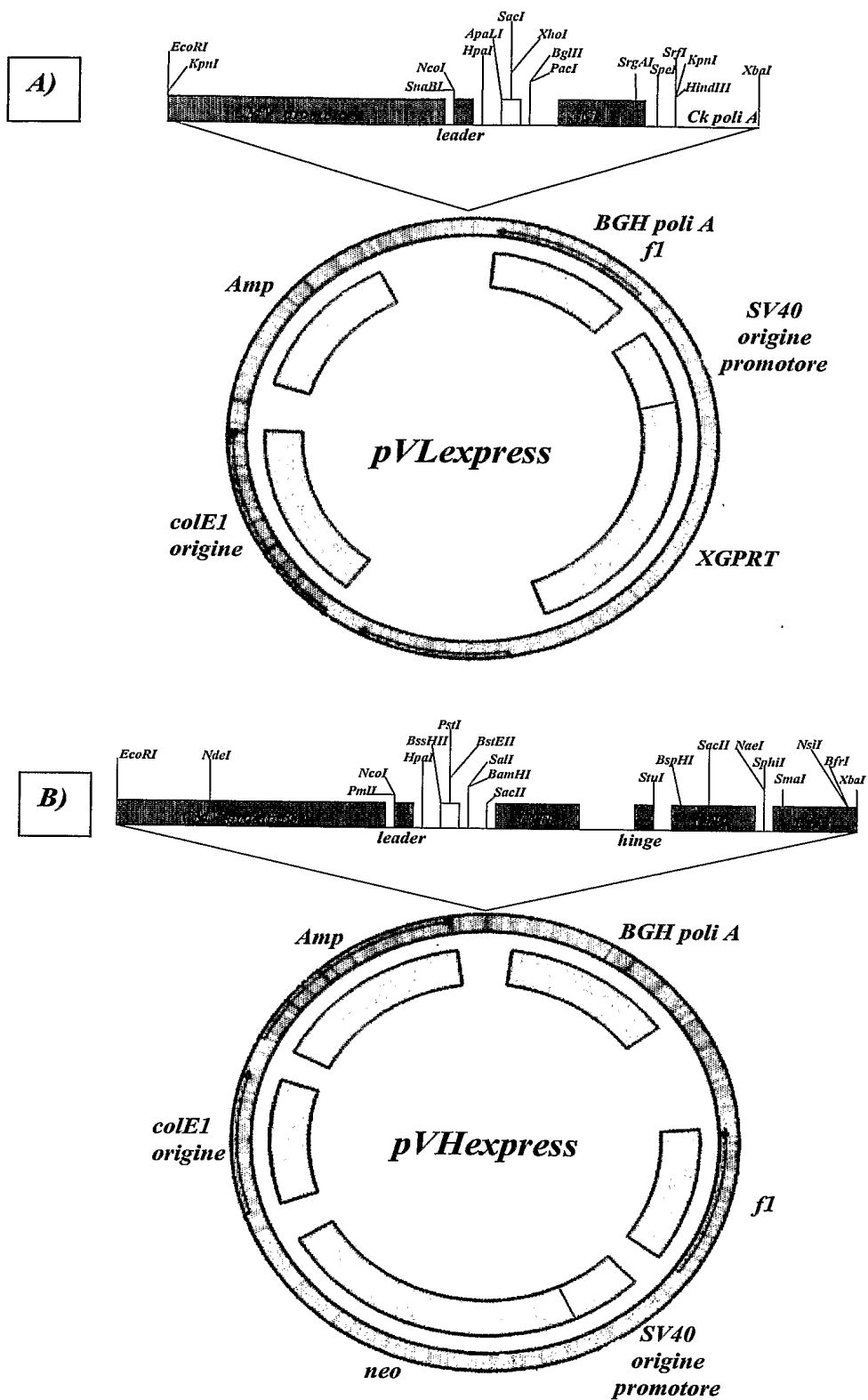
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
N° 820 B



18/23

RM 2003 A 000001

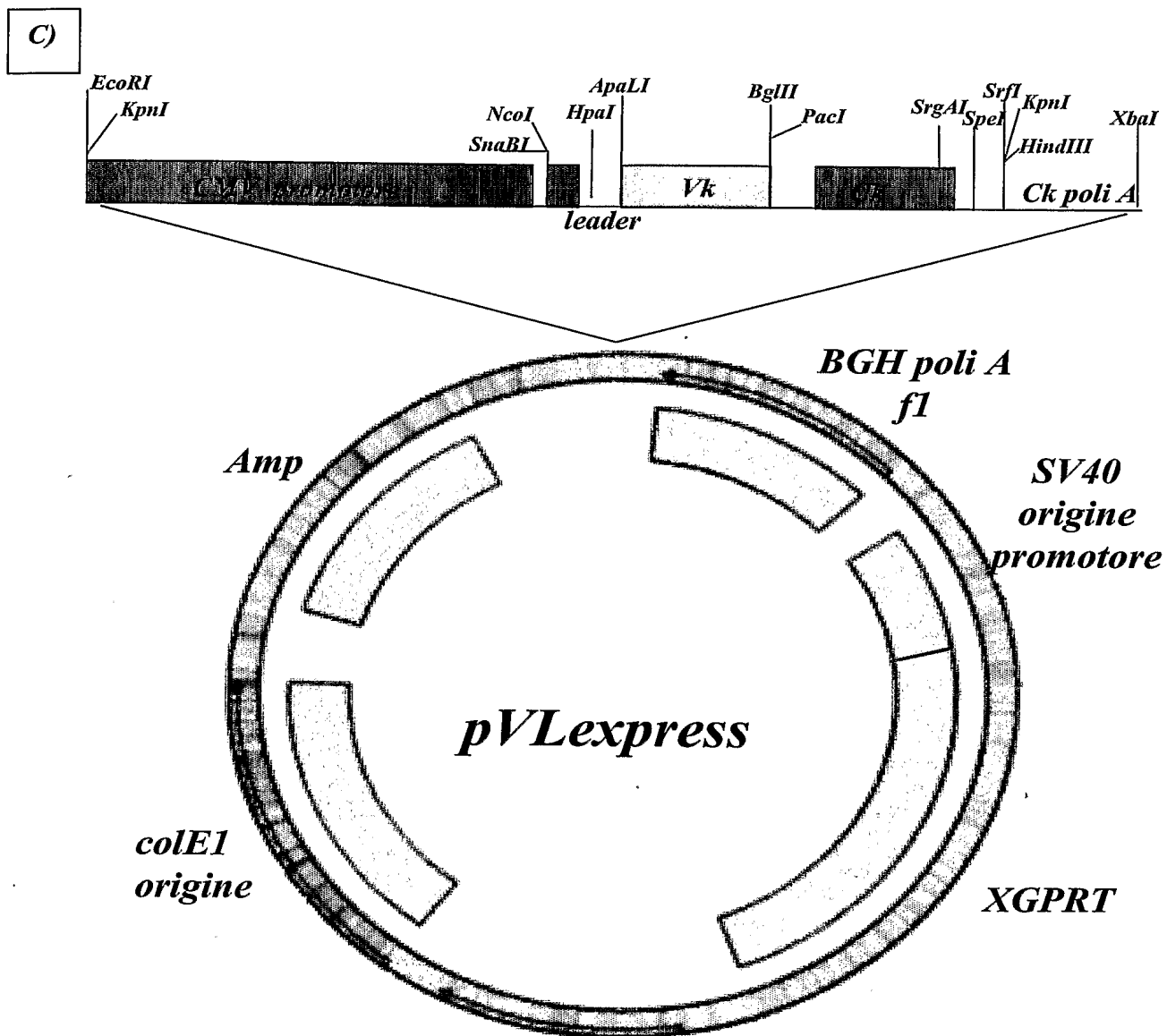
FIGURA 9 (1 di 3)



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Ch.

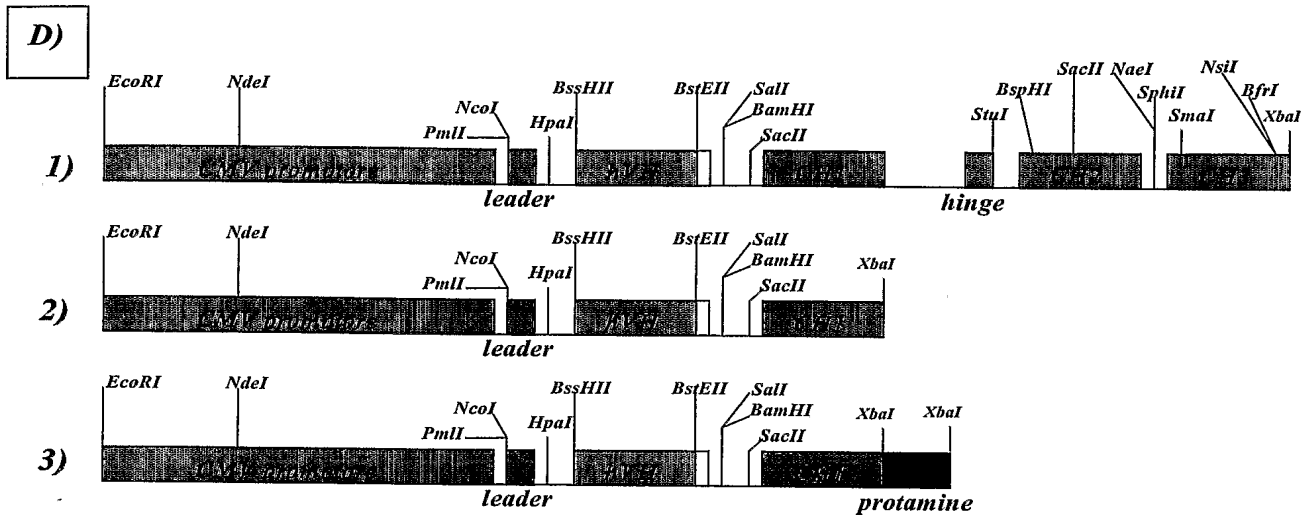
olga ch.

FIGURA 9 (2 di 3)

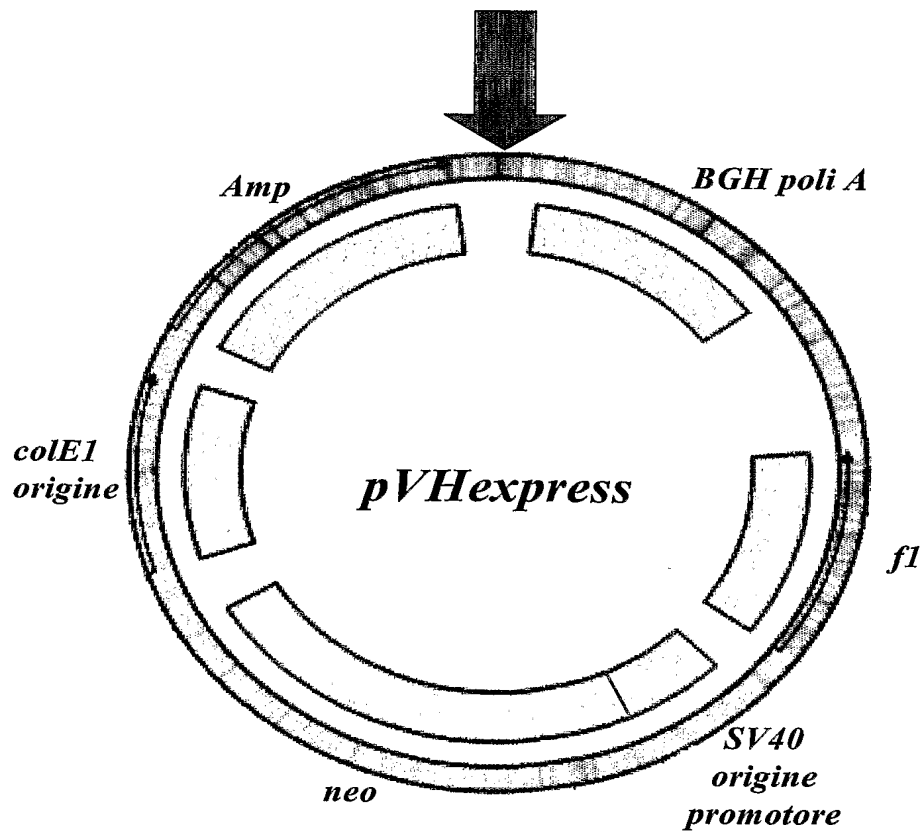


UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(No d'iscr. 820 B)
Olga Capasso

FIGURA 9 (3 di 3)



1) o 2) o 3)

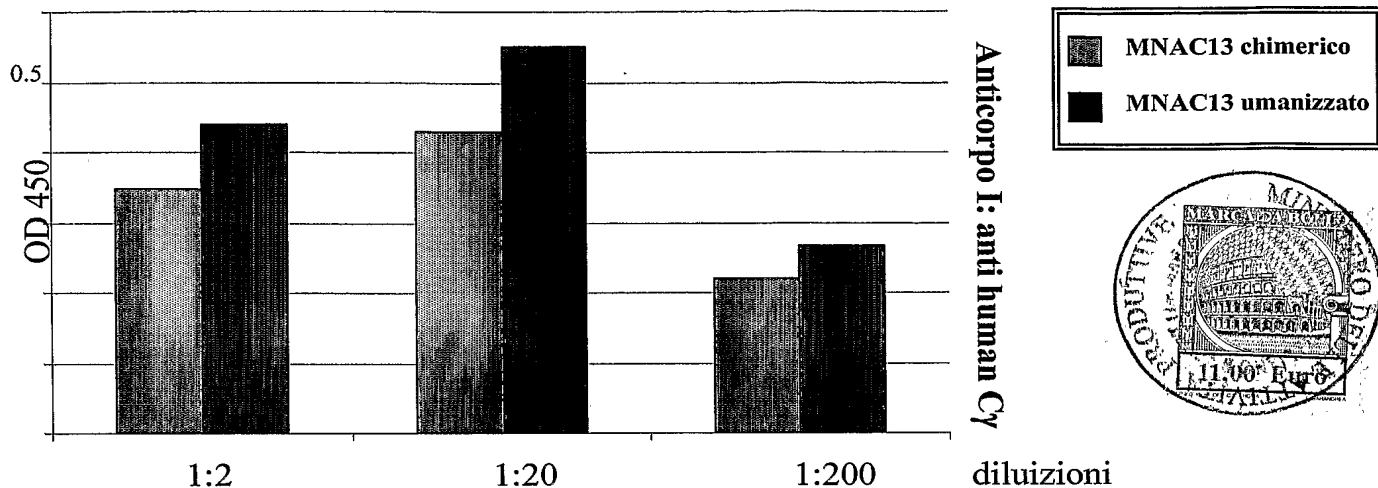


UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
Rita d'Amico (20 B)

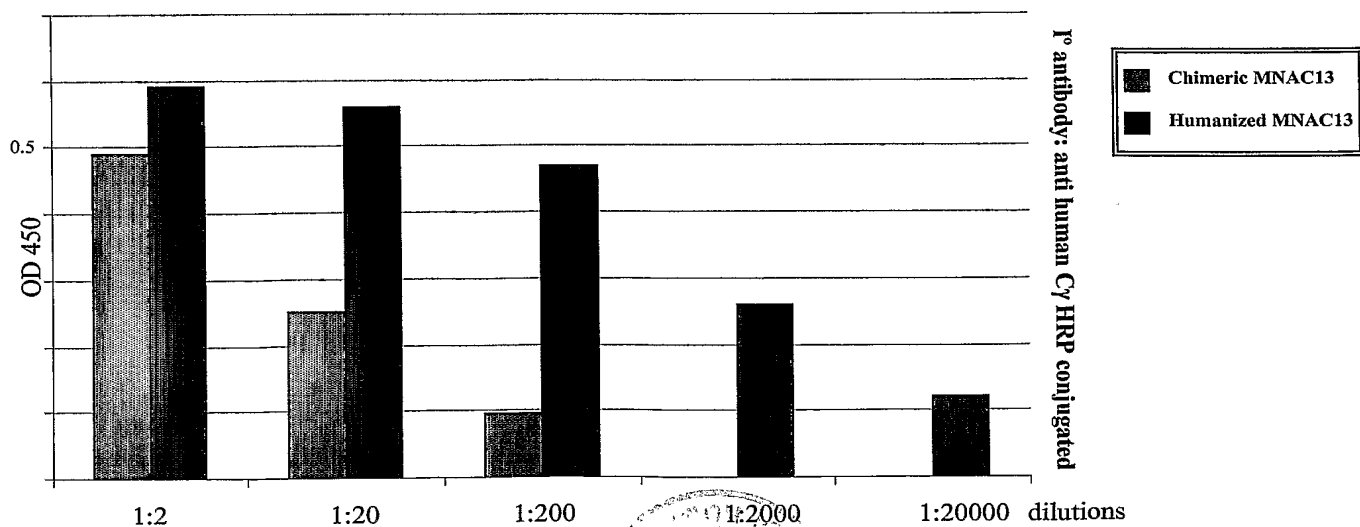
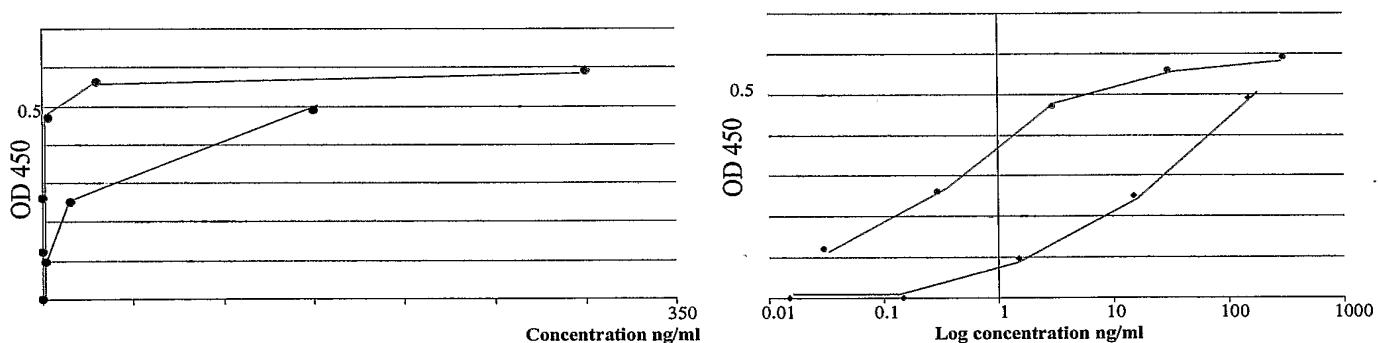
22/23

FIGURA 10 ATTIVITA' DI LEGAME VERSO TRKA

a) surnatanti di cellule COS transfettate



b) surnatanti di cellule COS transfettate purificati con proteina G sepharose

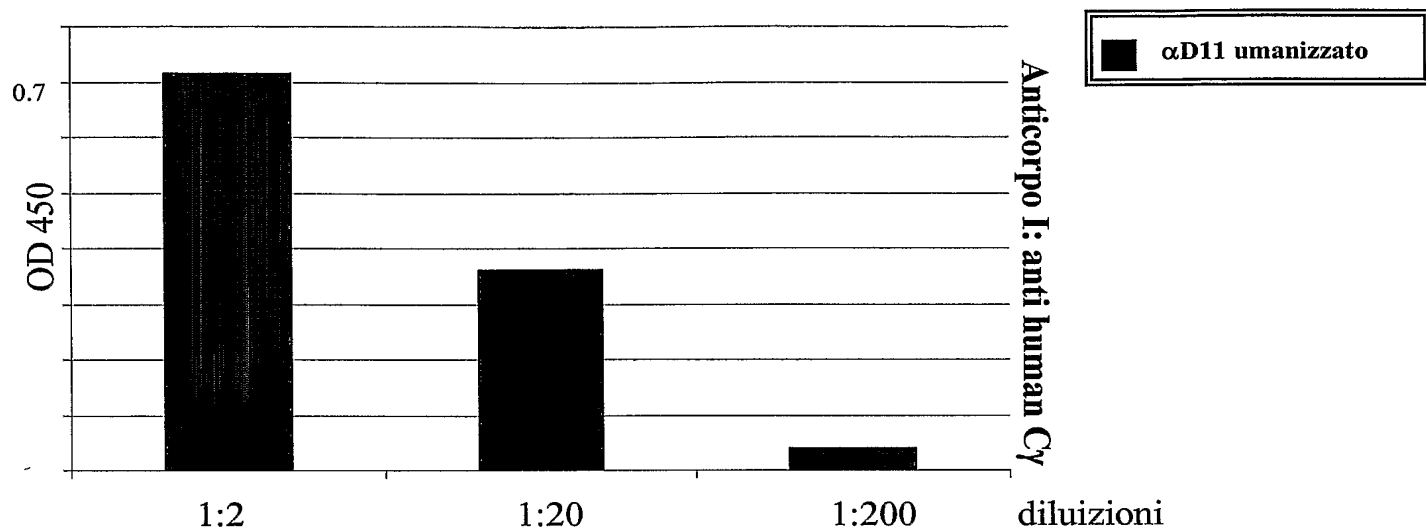


M

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

FIGURA 11

ATTIVITA' DI LEGAME VERSO NGF



UN MANDATARIO
Olga Capasso
(N° d'iscr. 20 B)